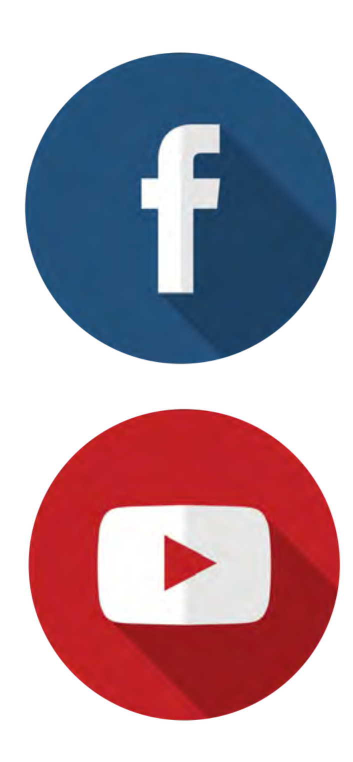
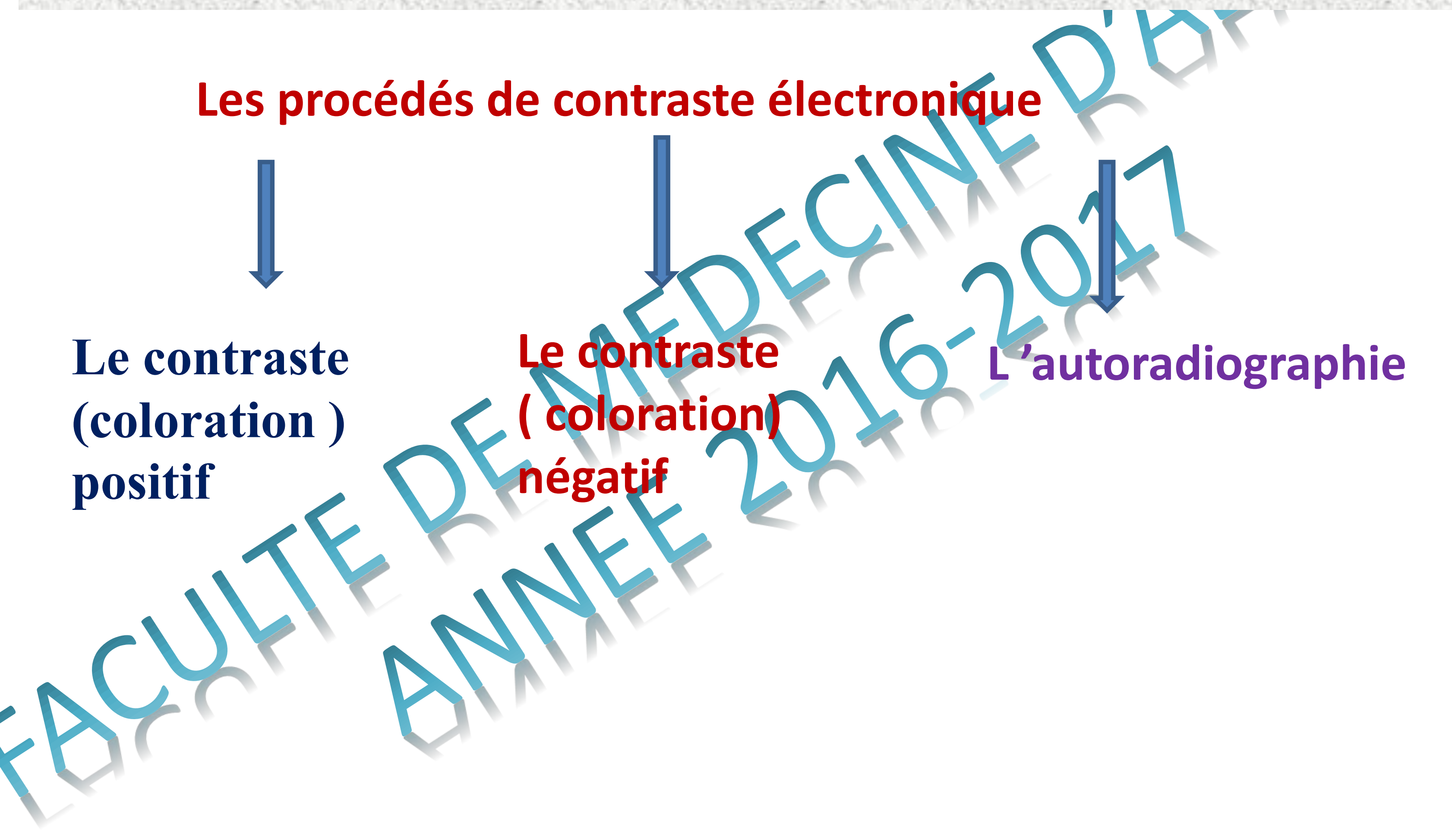
In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful







Objectif 4 : Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive , coloration négative , autoradiographie)



A - Le contraste (coloration) positif :

Les atomes majeurs de la matière biologique sont transparents aux électrons d 'ou la nécessité d'utiliser des sels de métaux lourds ; l' acétate d'Uranyl , Citrate de Plomb .

B - Le contraste (coloration) négatif :

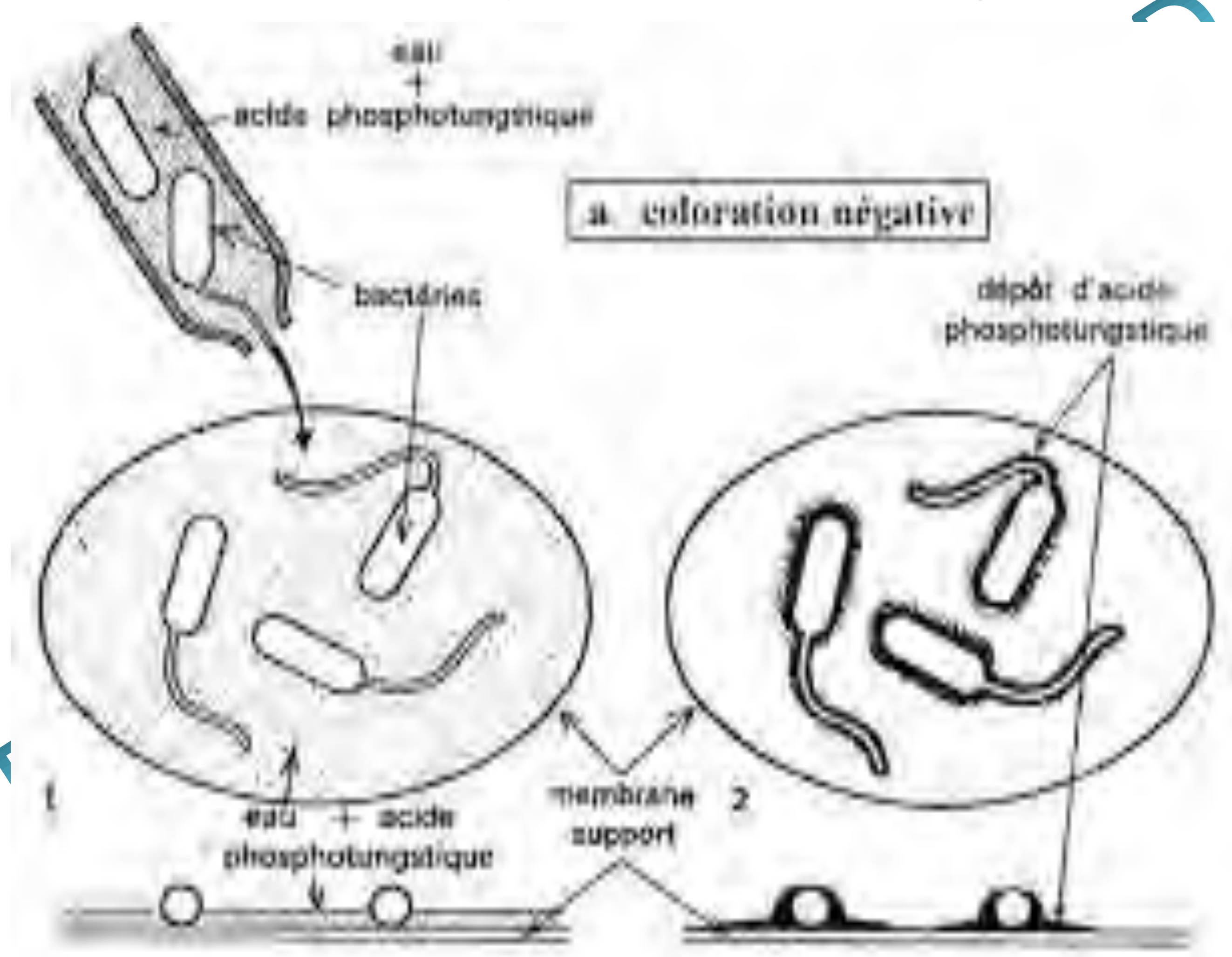
Le contraste négatif permet d'assombrir le fond sans colorer l'objet lui-même . Les structures apparaissent en « négatif » / en clair sur fond sombre

C – L 'autoradiographie

Suivi de molécules intracellulaires(protéines , acides nucléiques..) marquées par des isotopes radioactifs . tel : le C 14 , H 3 .

Objectif 4 :Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, coloration négative, autoradiographie

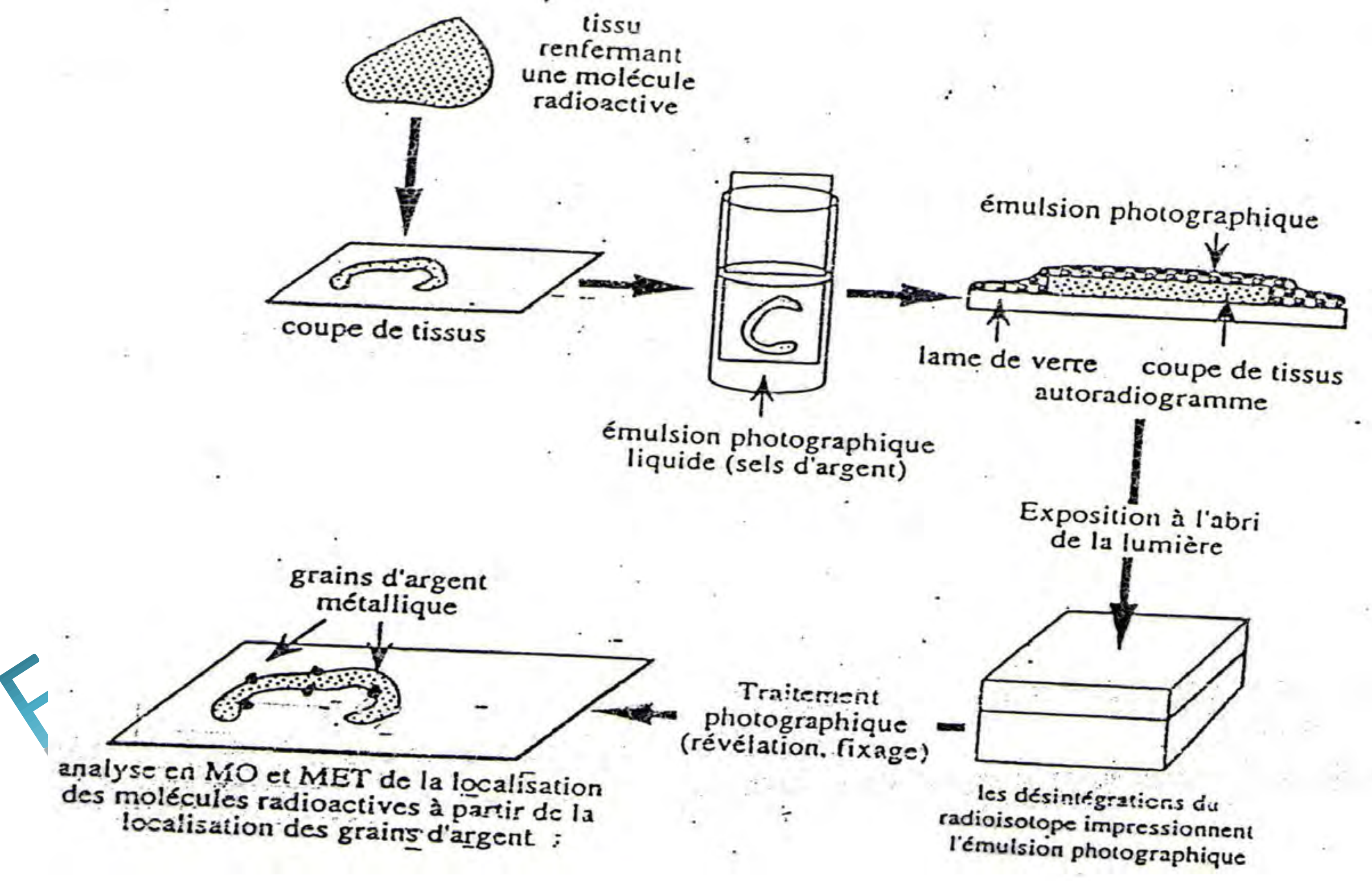
B - La technique de coloration négative



Principe du contraste négatif (p.32)

Objectif 4 :Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, coloration négative, autoradiographie

C – La technique d' autoradiographie (p.34)



émission d'un rayonnement β

cristal de Br Ag

observation

Grains d'Ag

émulsion

émulsion non visible

échantillon

support

Protéine ayant incorporé un acide aminé marqué au tritium (^{3}H)



Les grains d'argent indiquent les régions où sont localisées les molécules ayant incorporé les précurseurs radioactifs.



La technique d' autoradiographie

exposition

$AgBr \rightarrow Ag^{+} + Br^{-}$

émulsion { cristal d'AgBr ; gélatine }

coupe de tissu

L'isotope radioactif émet un rayonnement qui impressionne l'émulsion

lame ou grille

En chambre noire

révélation

$Ag^{+} + e^{-} \rightarrow Ag$

Le révélateur fournit les électrons qui transforment Ag+ en Ag métallique

fixation

grain d'argent

Le fixateur dissout les cristaux non irradiés

Les sels de Bromures d'argent (AgBr) contenus dans l'émulsion sont réduits par le rayonnement radioactif et apparaissent sous forme de grains noirs

Objectif 5 : Indiquer l'apport (but) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

A – le contraste (coloration) positif :

But : Décrire finement les structures intracellulaires

Donc réaliser une étude ultra structurale

Objectif 5 : Indiquer l'apport (but) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

Ultrastructure d'un monocyte sanguin X 20 000

Zones claires

↓

é transmis

Nu

Zones sombres opaques aux é

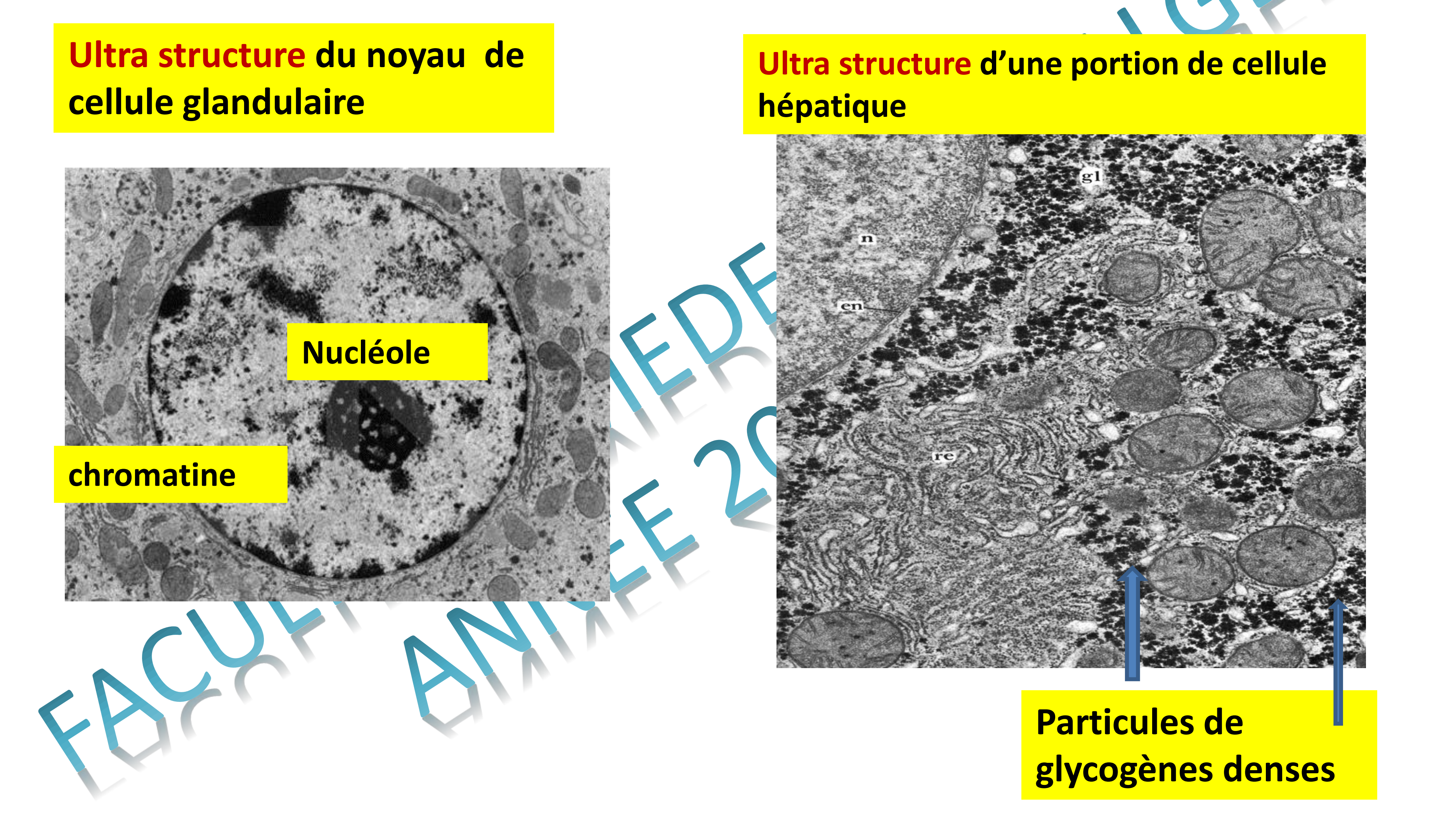
↓

é arrêtés



Contraste positif

Objectif 5 : Indiquer l'apport (but) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon



Objectif 5 : Indiquer l'apport (but) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

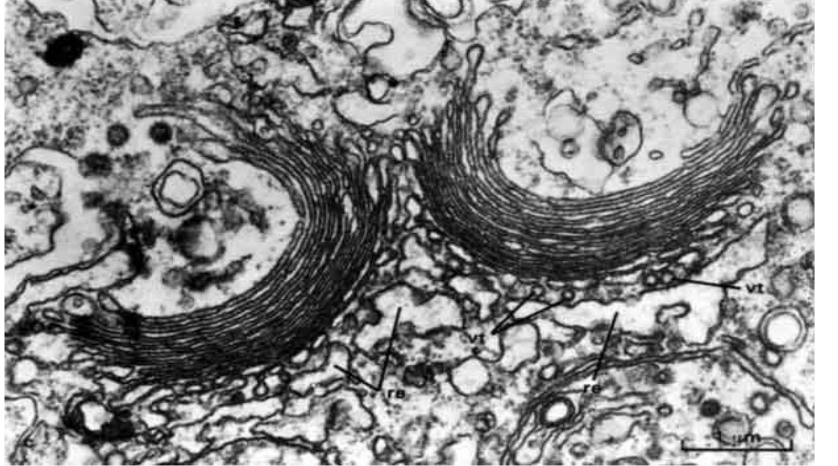
Observation de détails plus fin

Ultra structure de mitochondrie / REG

REG

Ultra structure de la membrane plasmique du globule rouge

Ultra structure de l'appareil de GOLGI



Objectif 5 : Indiquer l'apport (but) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

Bactérie 70 000 x



Virus du sida dans la cellule hôte

Légender la micrographie ci-dessus

Objectif 5 : Indiquer l'apport (but) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

B - Technique de coloration négative

BUT :

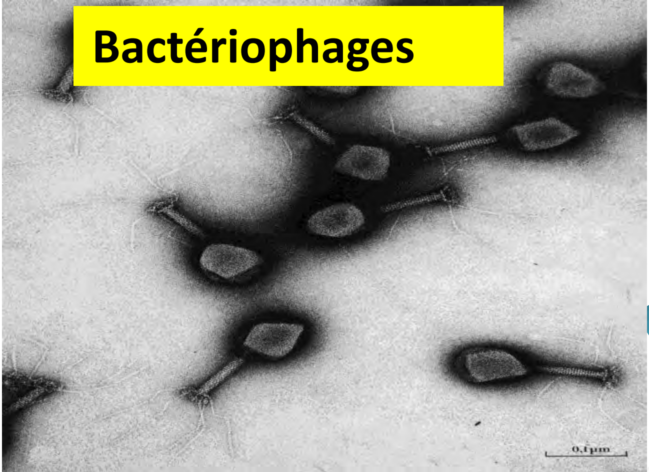
Description morphologique (morphologie externe) de macromolécules(ATP osomes) ou d'organites (ex :les ribosomes), de virus , bactérie , mais après isolement .

Architecture moléculaire des éléments du cytosquelette (microtubules , microfilament d'actine..), de la chromatine , des pores nucléaires , mais après isolement .

Objectif 5:Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

B- Contraste par coloration négative

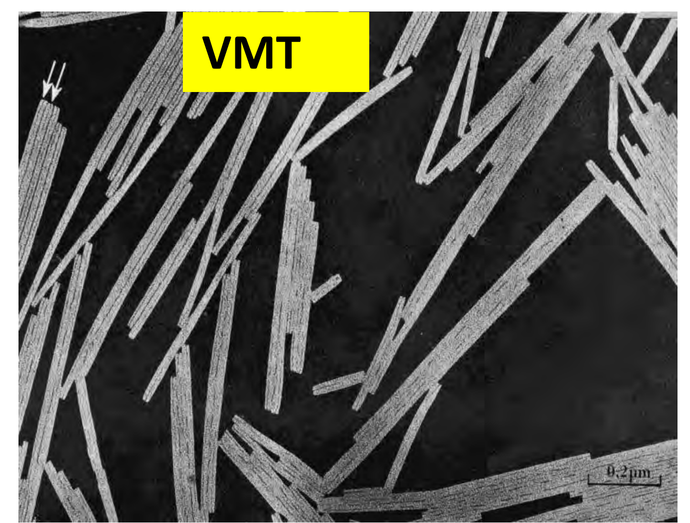
Morphologie externe de virus isolés à partir de cellules infectées



Ces différents virus apparaissent en clair sur un fond sombre

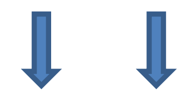
Virus Ebola

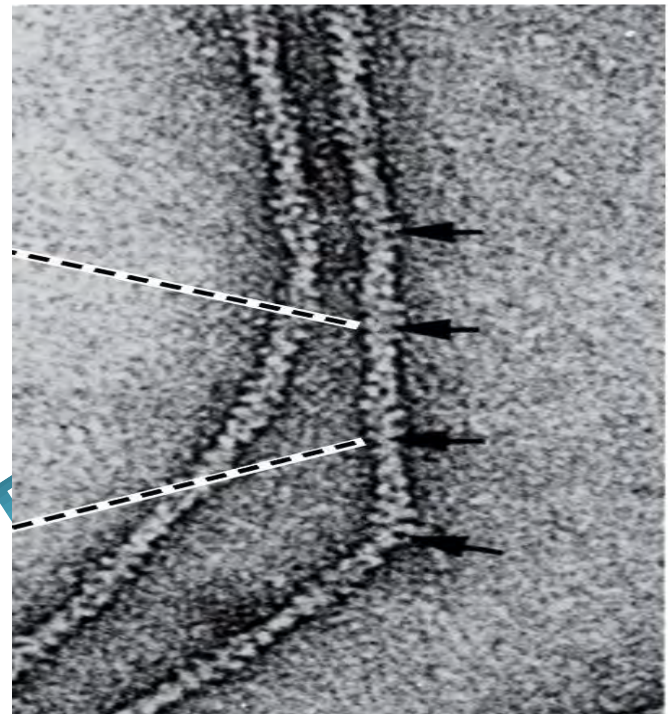




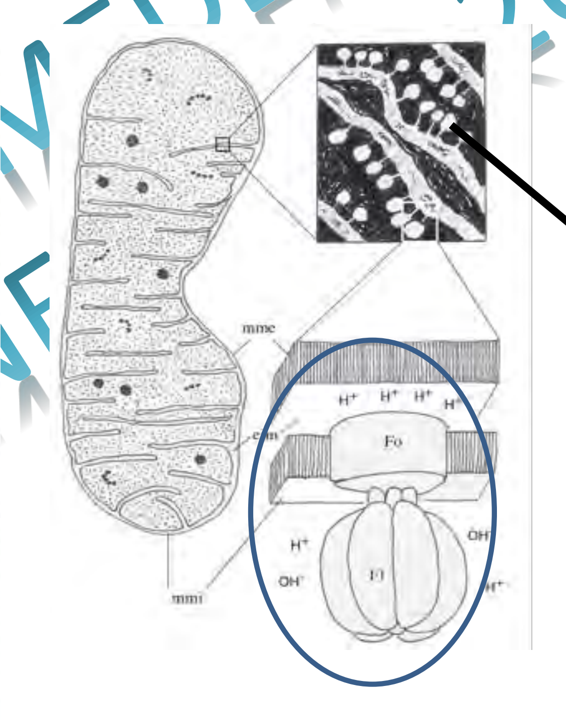
Objectif 5:Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

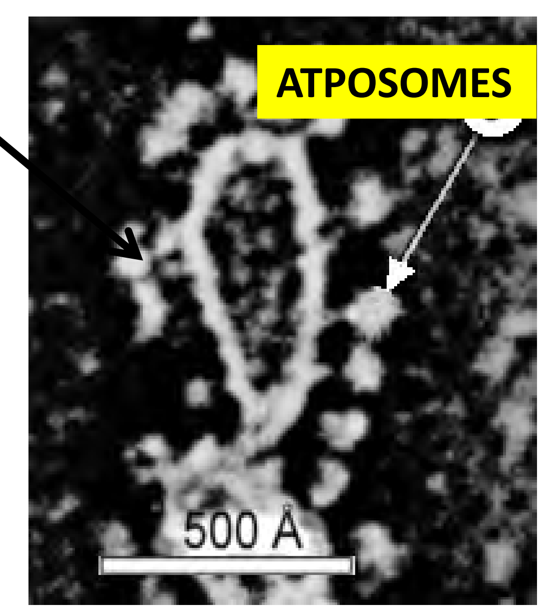
Architecture moléculaire des Microfilaments d'actine





Morphologie externe des ATPosomes de la crête mitochondriale





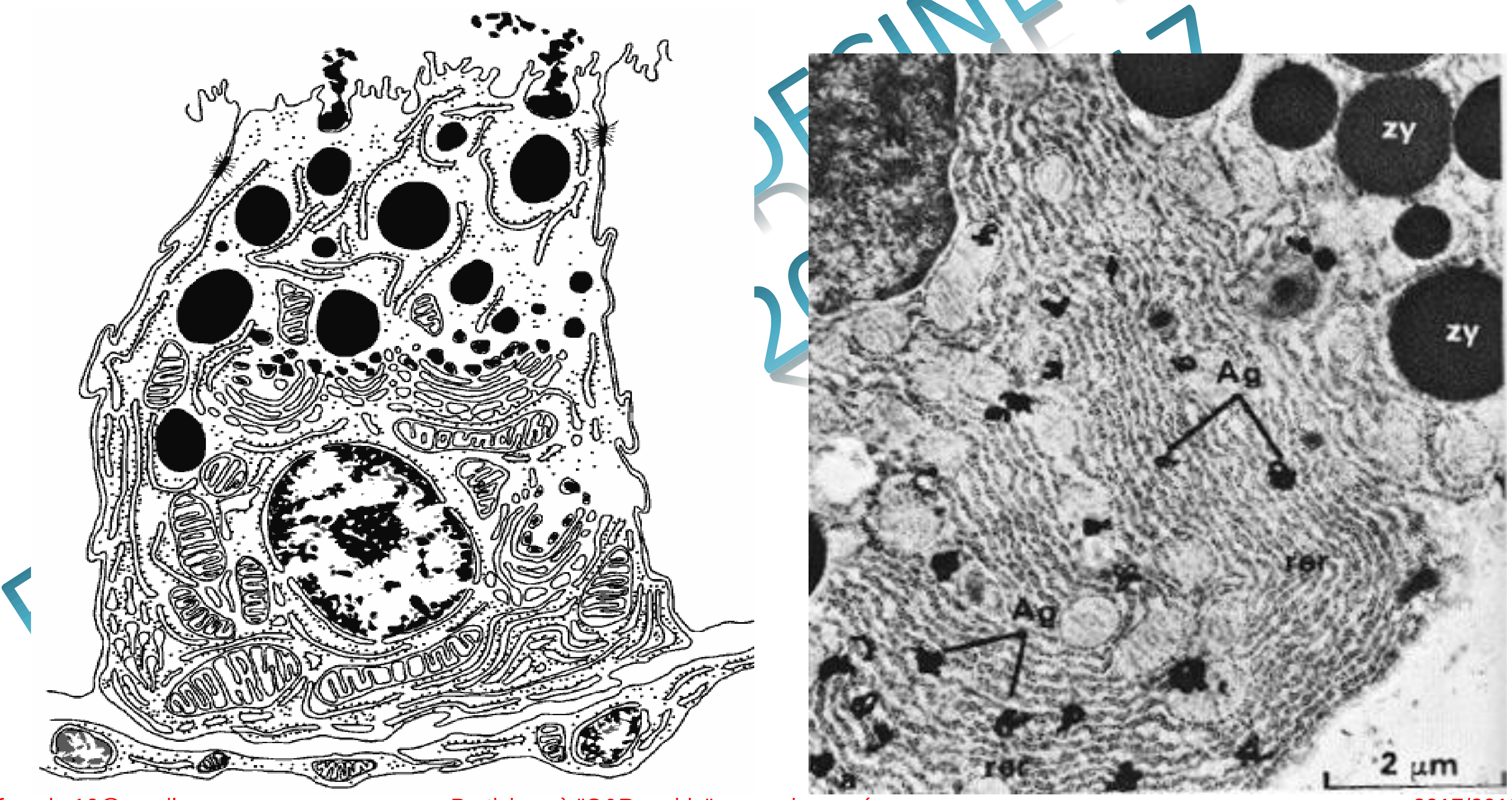
Objectif 5 : Indiquer l'apport (but)de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

C - La Technique d'autoradiographie

But : **Etudie la Cinétique d'un métabolisme cellulaire ou localisation de molécules organiques et suivi de leur cinétique (tableau p.14) .**

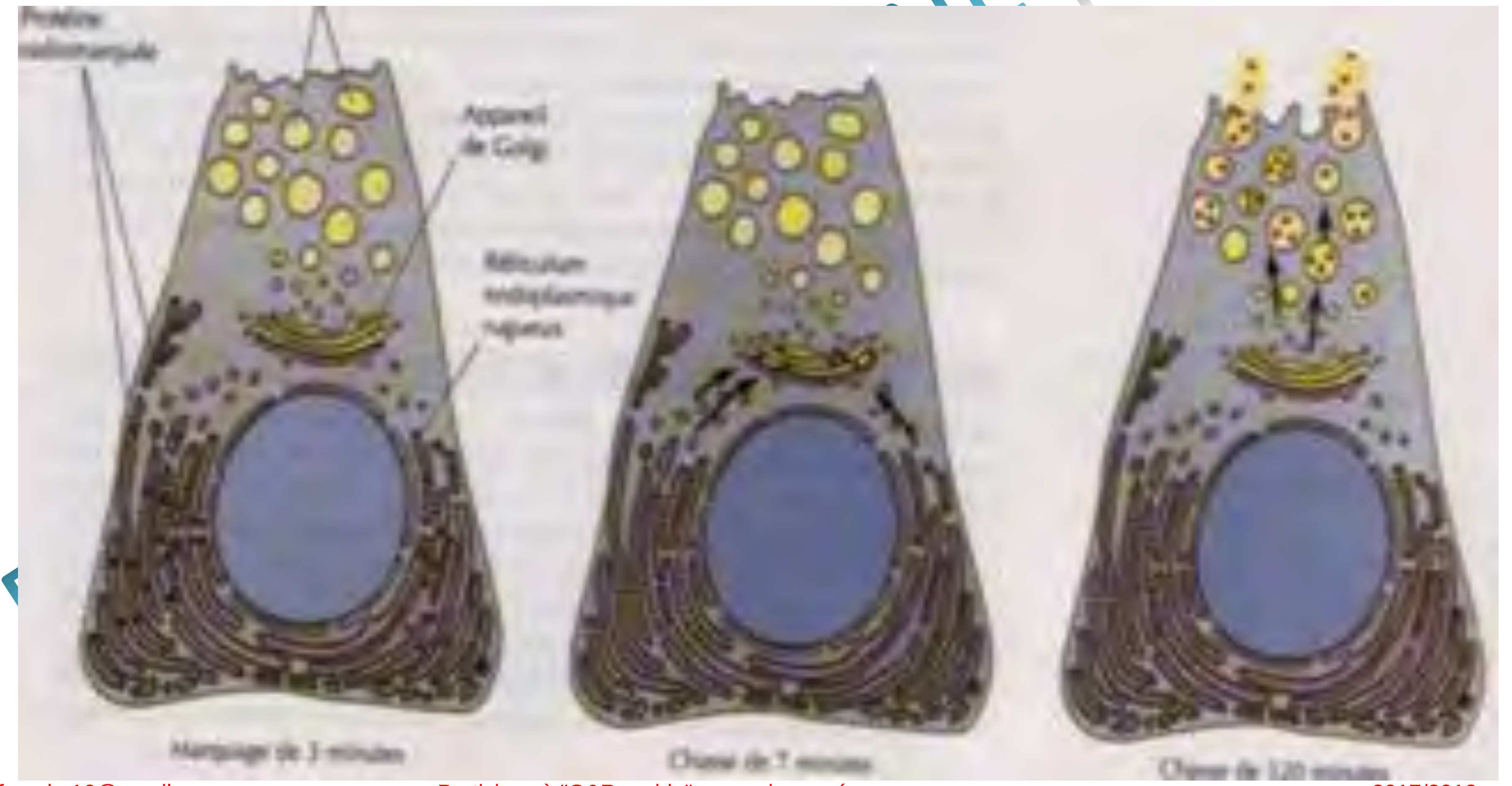
Objectif 5 : Indiquer l'apport (but)de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

Marquage à la leucine radioactive et suivi des protéines nouvellement synthétisées dans la cellule pancréatique



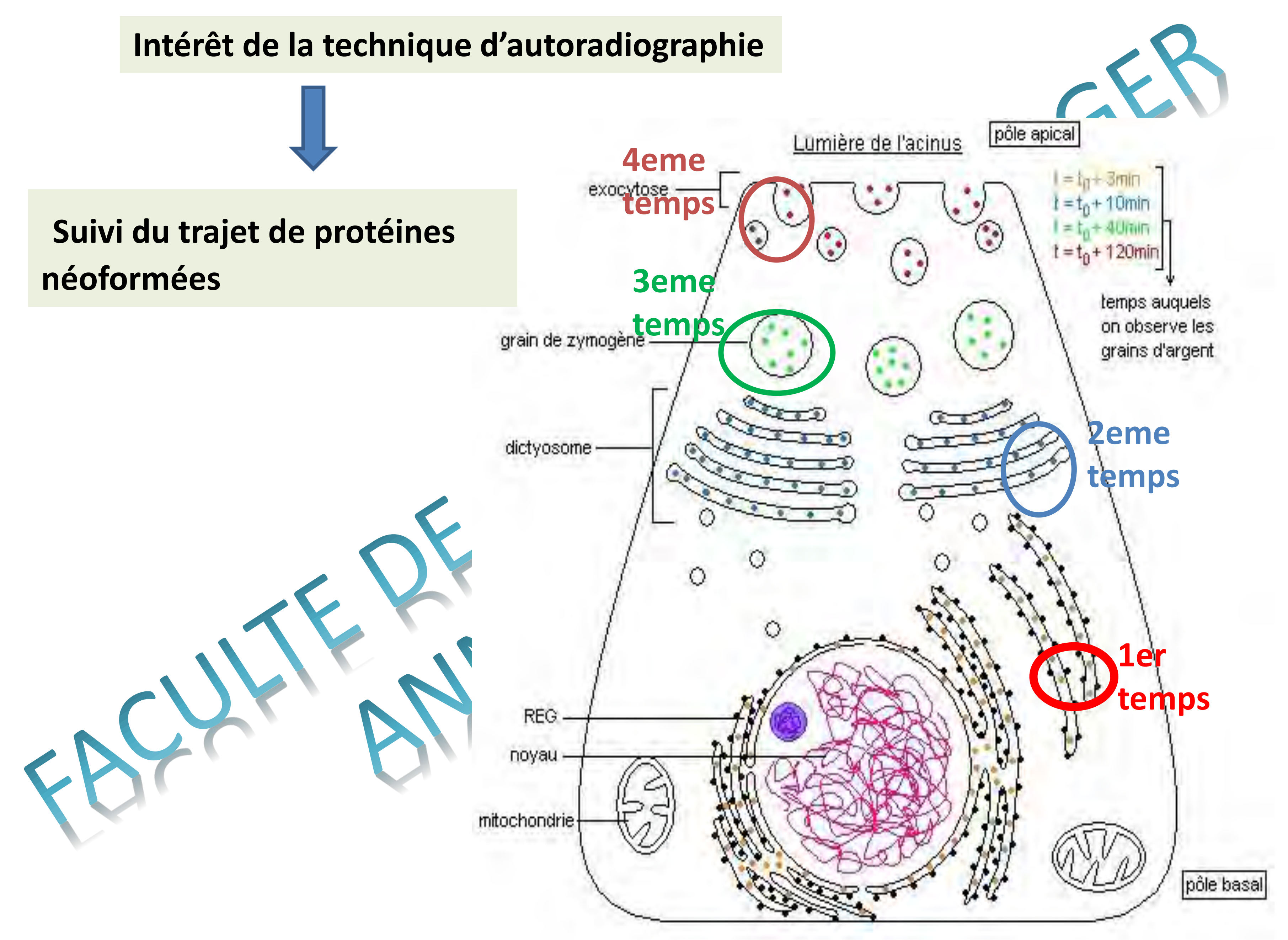
Objectif 5 : Indiquer l’apport(but)de chaque procédé de contraste électronique dans l’analyse morphologique d’un échantillon

Cinétique de la synthèse et de l’emballage des produits de sécrétion (protéines) dans une cellule pancréatique



Intérêt de la technique d'autoradiographie

Suivi du trajet de protéines néoformées



Cinétique des acides nucléiques

Marquage à l'uracile H3 (précurseur radioactif) et suivi de l'ARN m

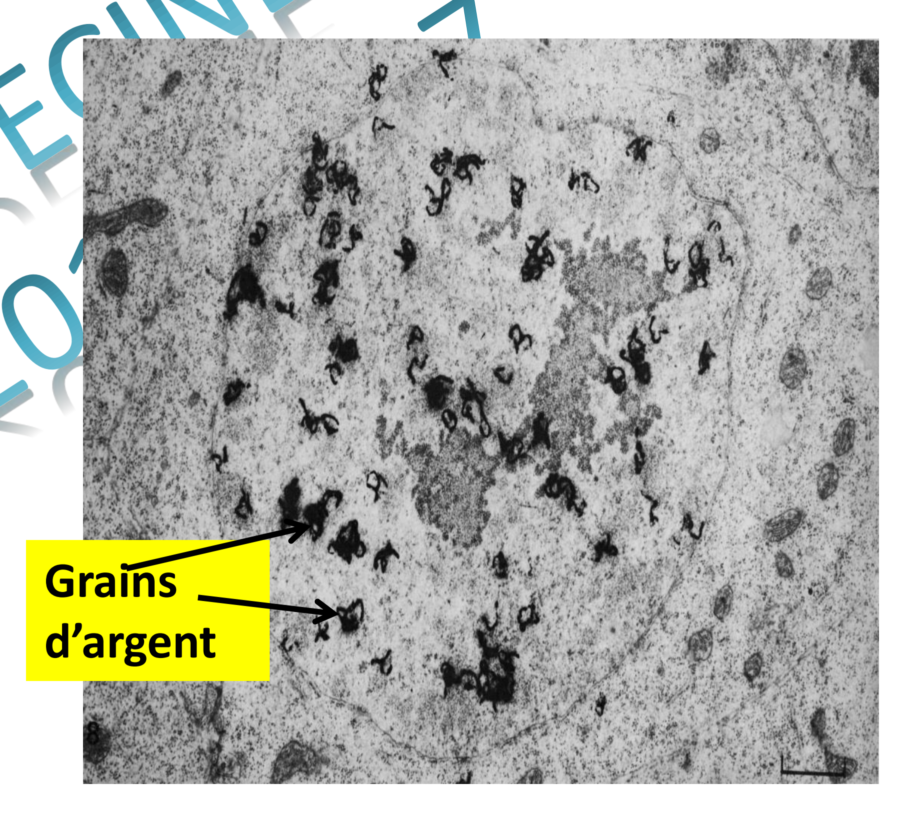
1er temps

Grains d'Ag au niveau du noyau

2eme temps

Grains d'Ag au niveau du cytoplasme

Marquage à la Thymine radioactif et localisation de l'ADN dans le noyau



Objectifs spécifiques

B – Le microscope électronique à balayage

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.
Objectif 2 : Déterminer les domaines de son utilisation.
Objectif 3 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique).

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.

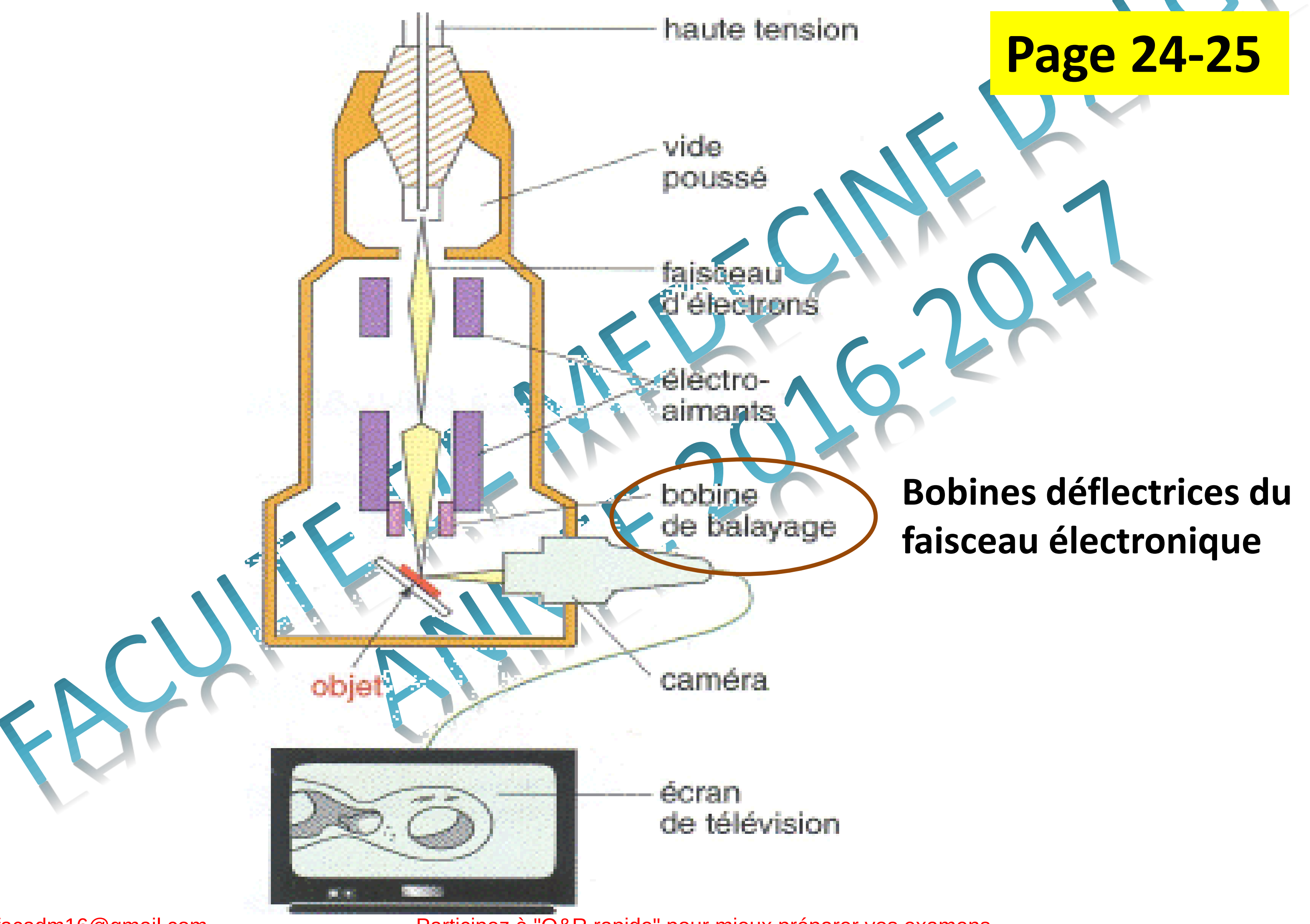
Principe de fonctionnement du MEB : observation par réflexion



Colonne électronique sous vide

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.

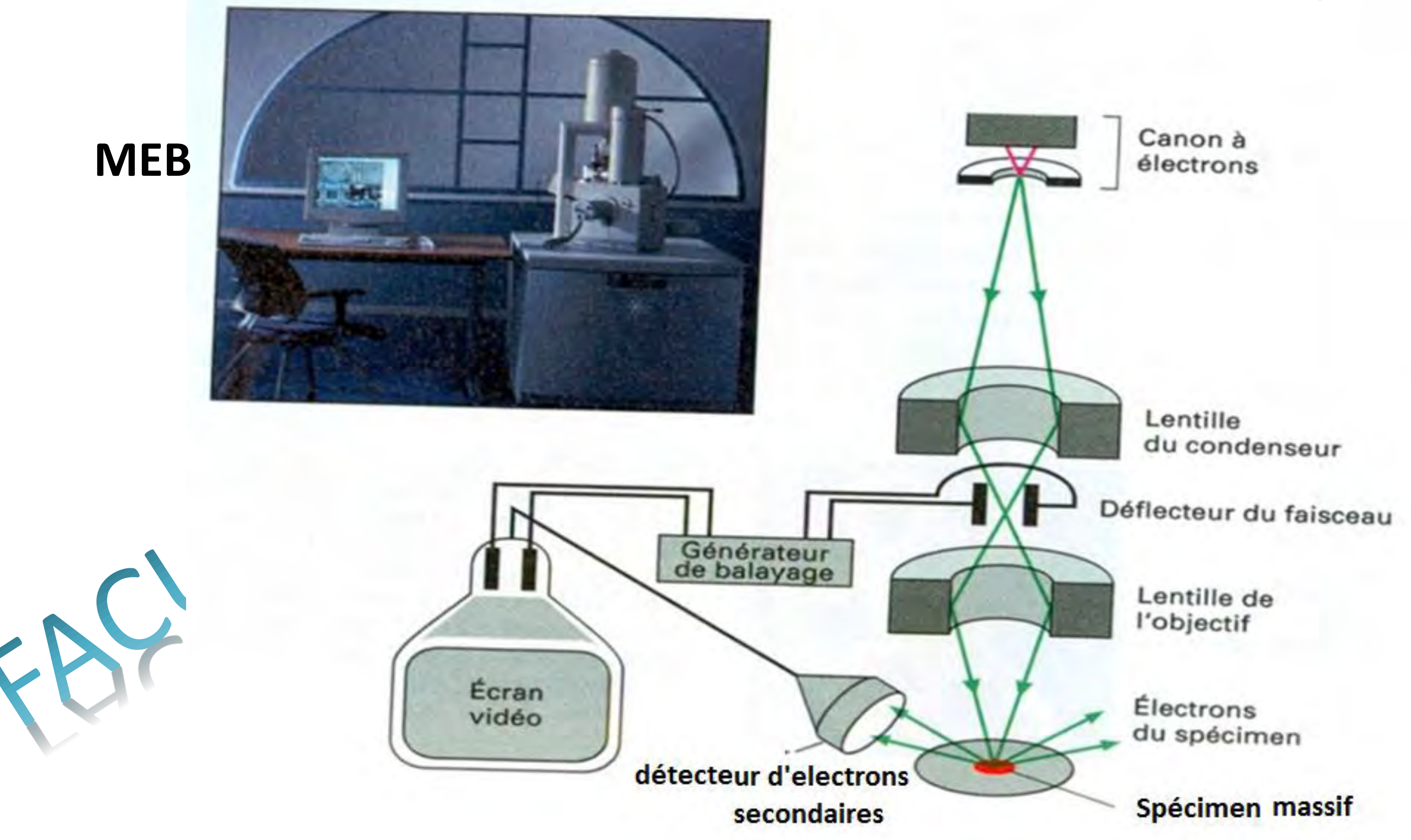
Page 24-25



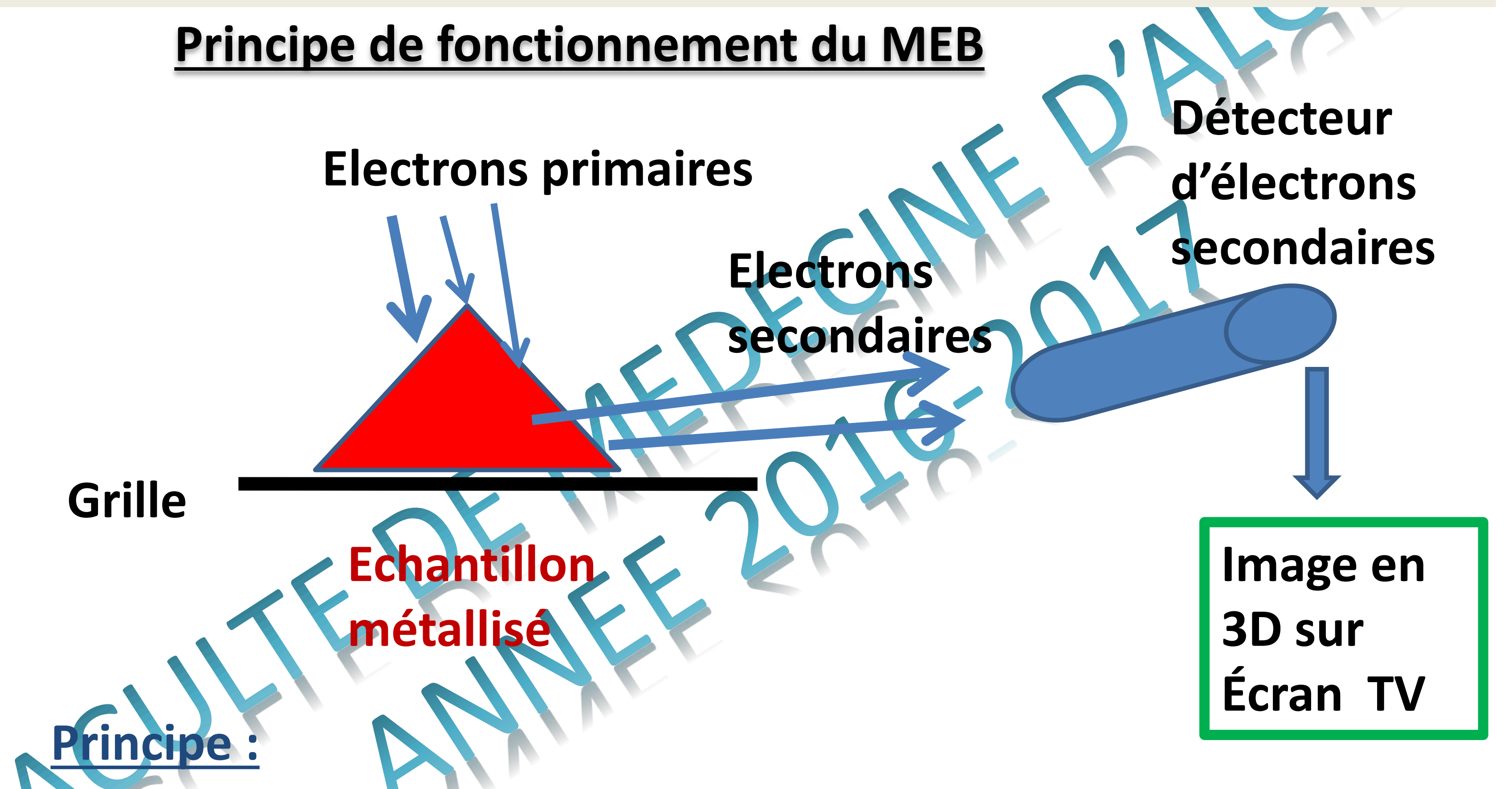
Bobines déflectrices du faisceau électronique

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.

L'observation par réflexion : système de balayage



Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.



Principe :

Contraste de la surface par **ombrage métallique** et son **balayage** par le faisceau d'électrons

Objectif 2: Déterminer les domaines d'utilisation du MEB

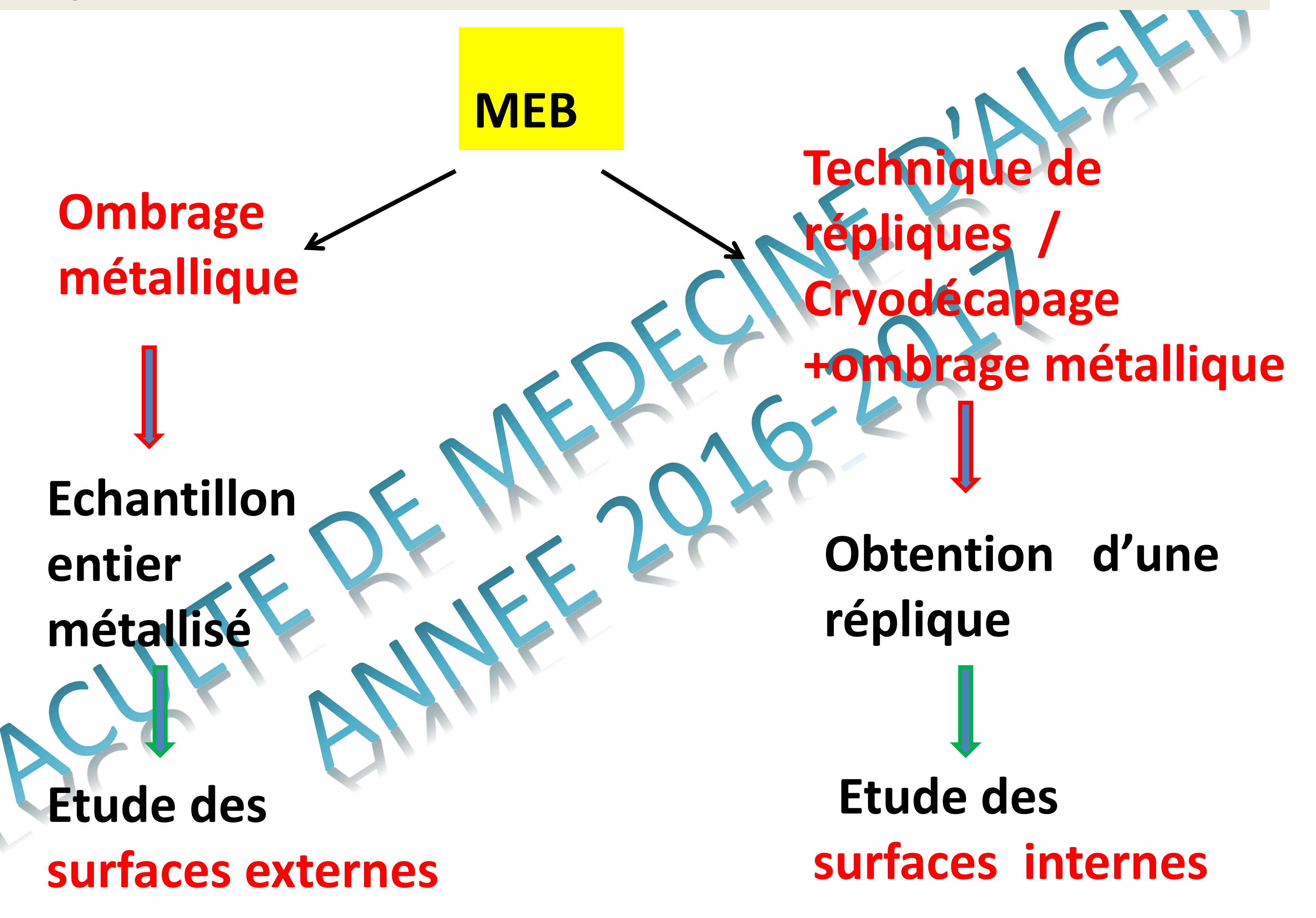
La microscopie électronique à balayage

But :

Etude morphologique en 3D :

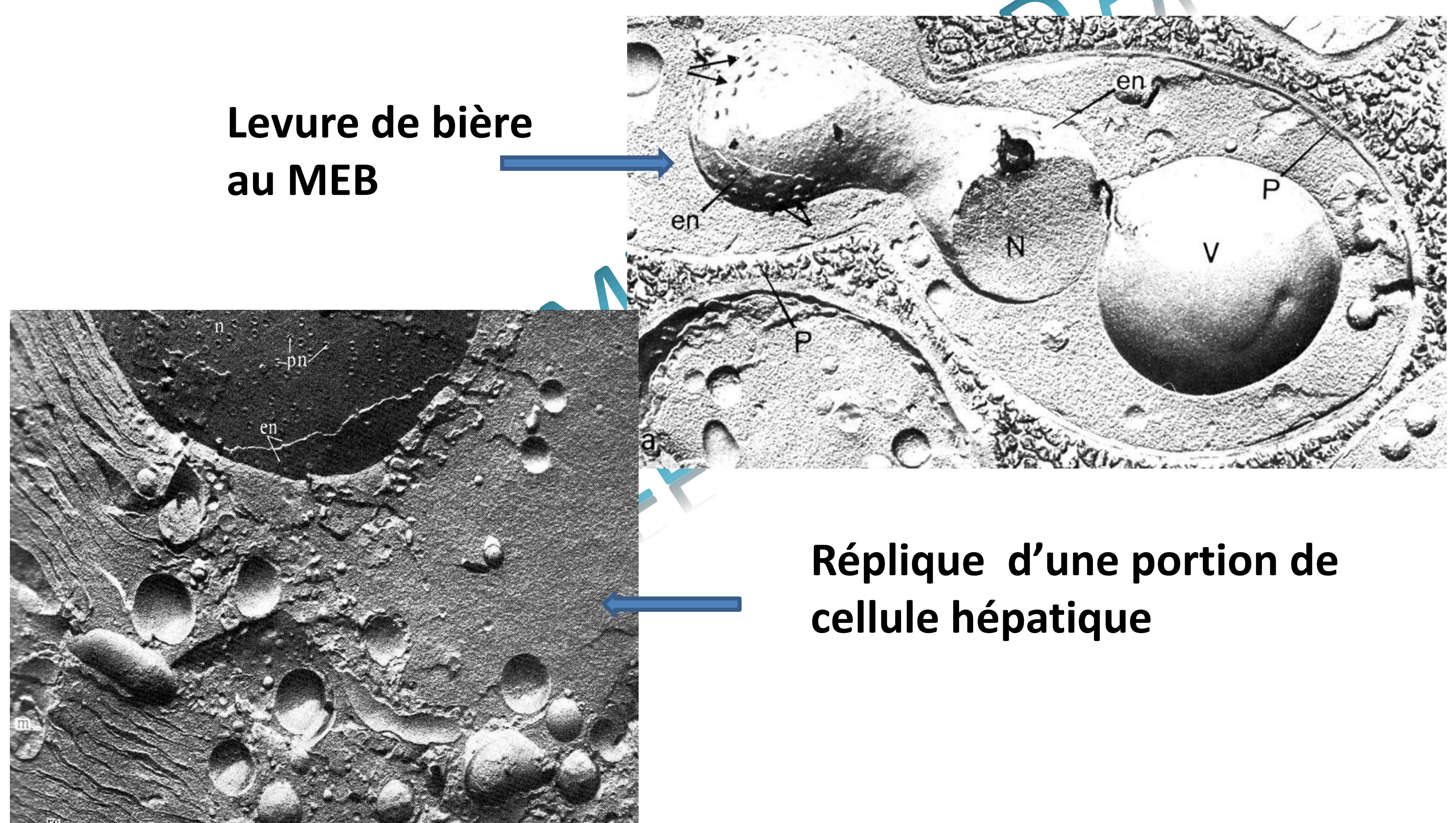
Révéler les surfaces externes ou internes d'échantillons à étudier .

Objectif 2 : Déterminer les domaines d' utilisation du MEB .



Objectif 2 : Déterminer les domaines d'utilisation du MEB .

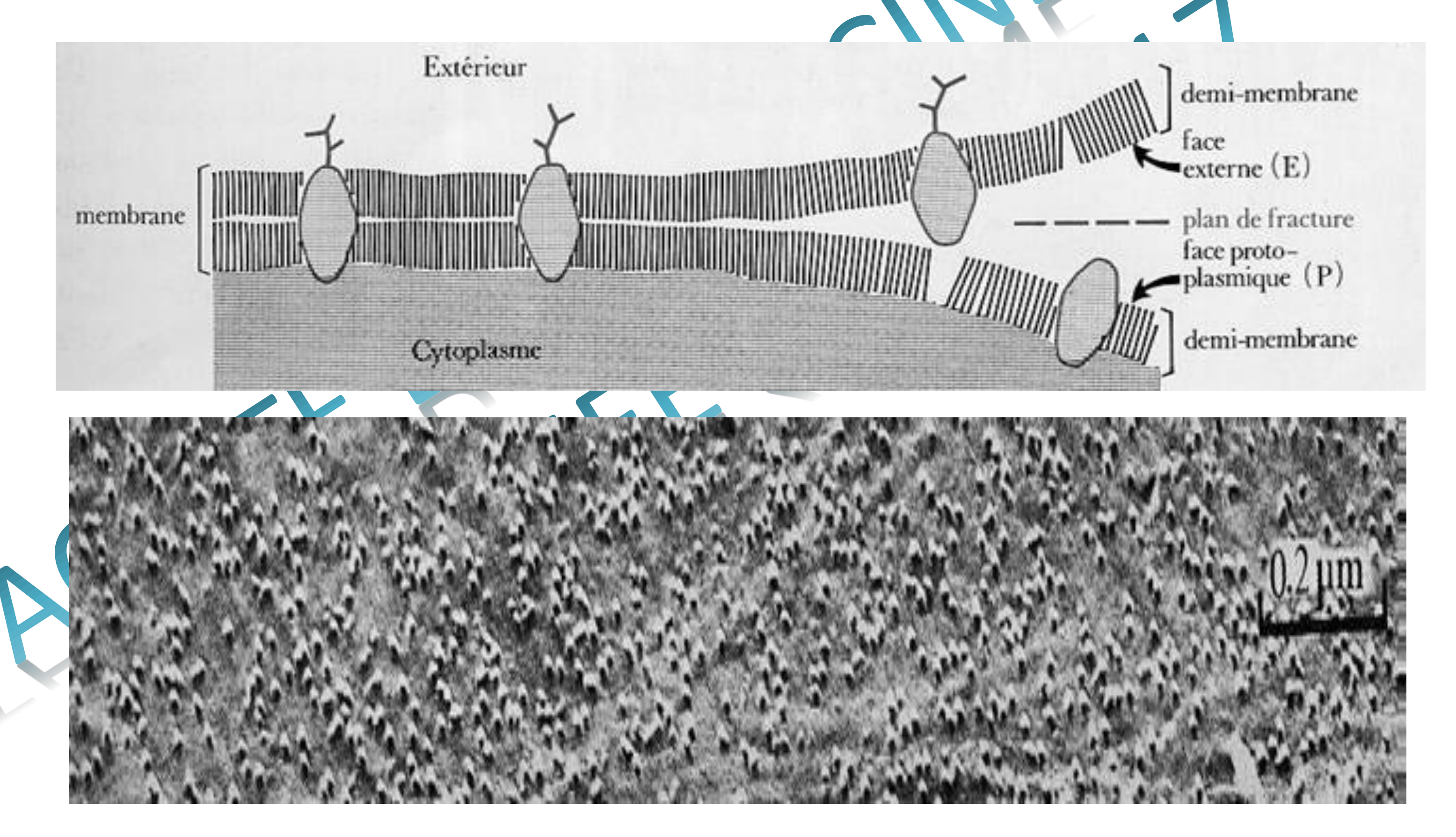
1 - Observation de répliques de surfaces internes après cryodécapage



Objectif 2 : Déterminer les domaines d’ utilisation du MEB .

Observation de réplique après cryodécapage

Réplique de la membrane plasmique (surface interne)et mise en évidence de particules membranaires



Objectif 2 : Déterminer les domaines d’ utilisation du MEB

[redacted] surfaces externes [redacted]



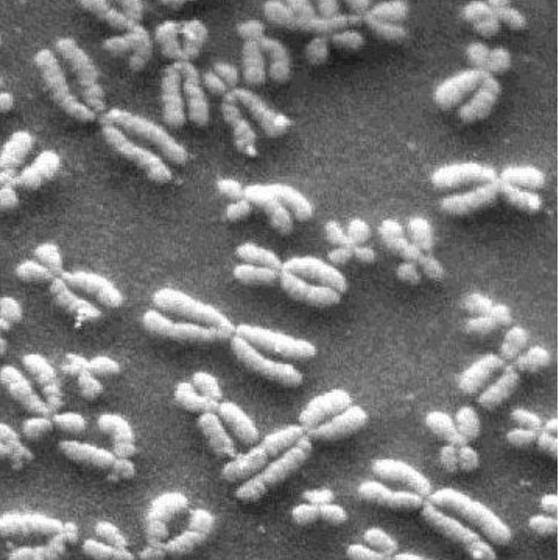
Objectif 2 : Déterminer les domaines d’ utilisation du MEB

Observation de surfaces externes d’échantillons entiers

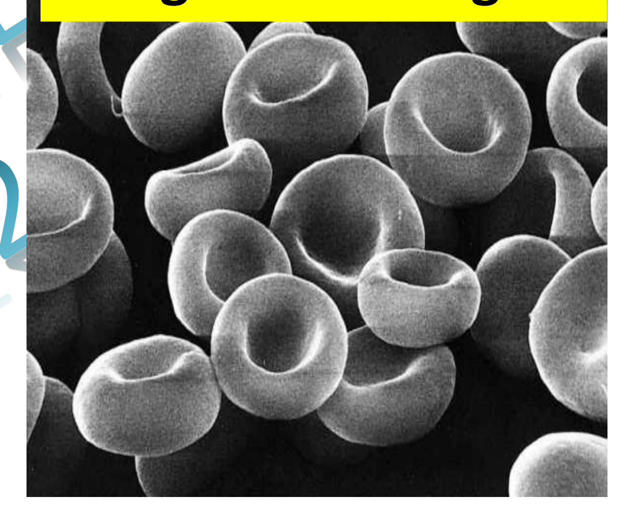
Caillot sanguin



Chromosomes humains



Aspect biconcave des globules rouges



Objectif 3 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique)

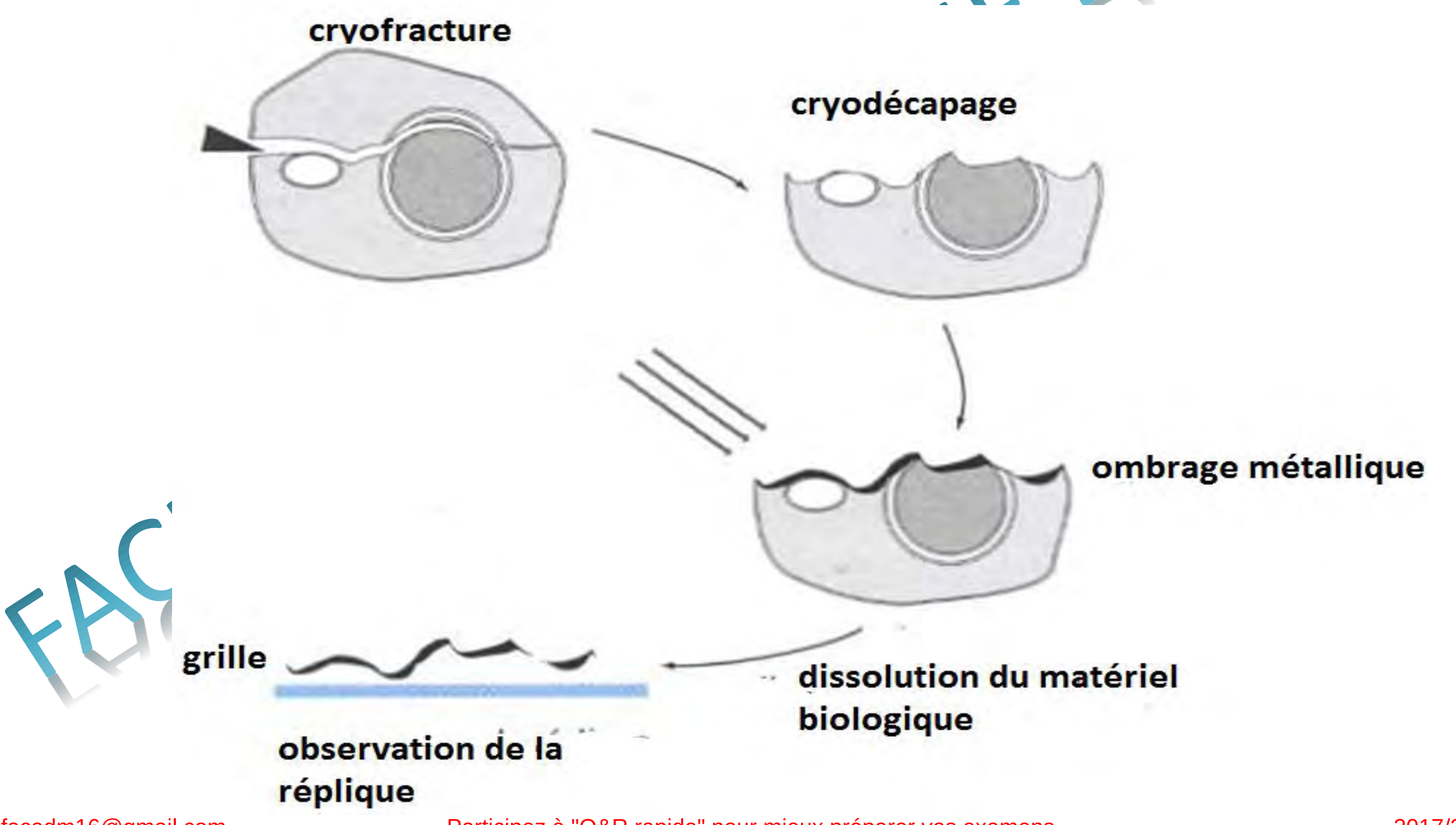
La technique de cryodécapage ou de réplique(surfaces internes)

La technique de cryodécapage est généralement applicable au MEB et s'effectue comme suit :

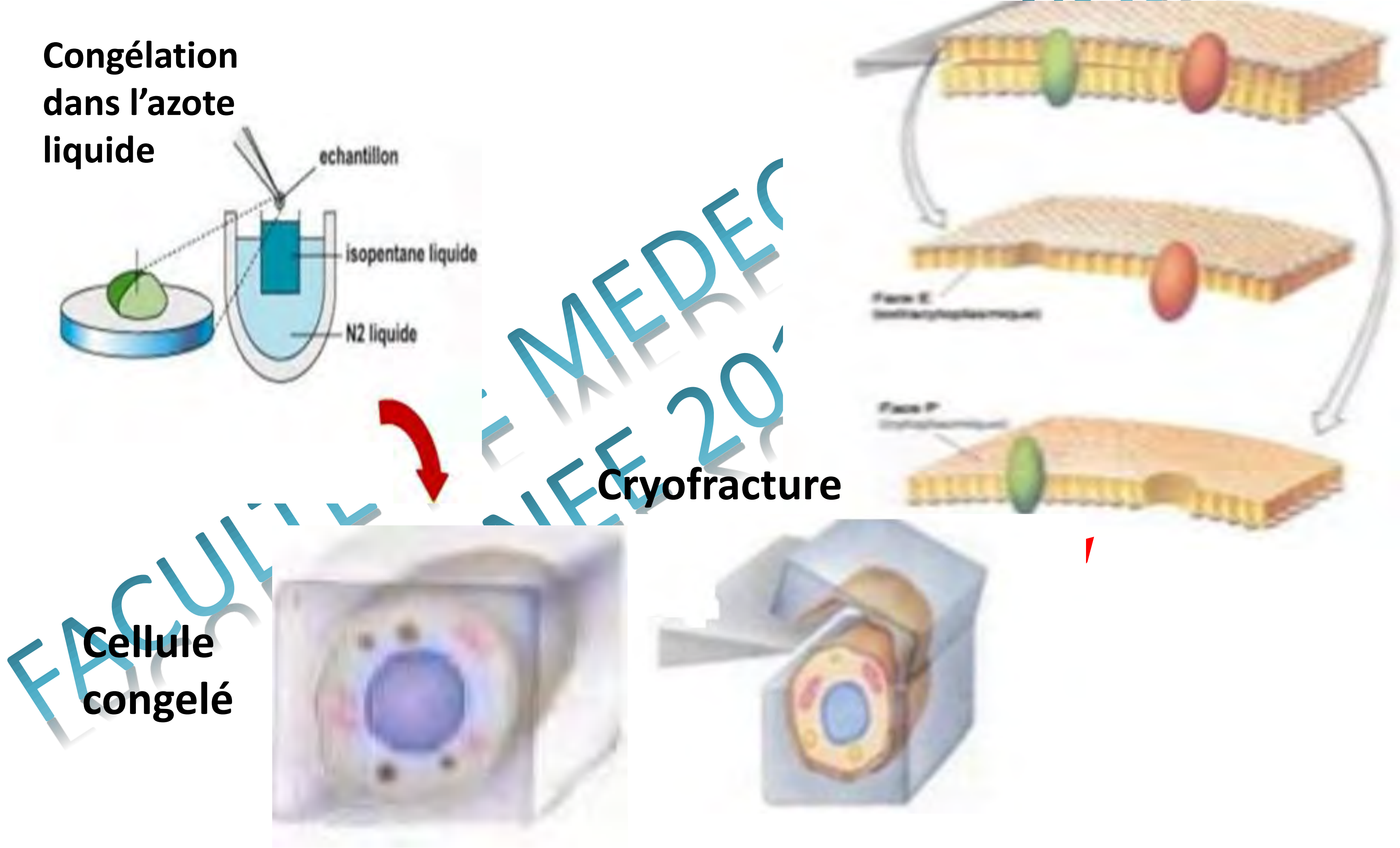
La congélation de l'échantillon
la cryofracture
Le décapage
l' ombrage métallique
l'obtention de la réplique

Objectif 3 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique)

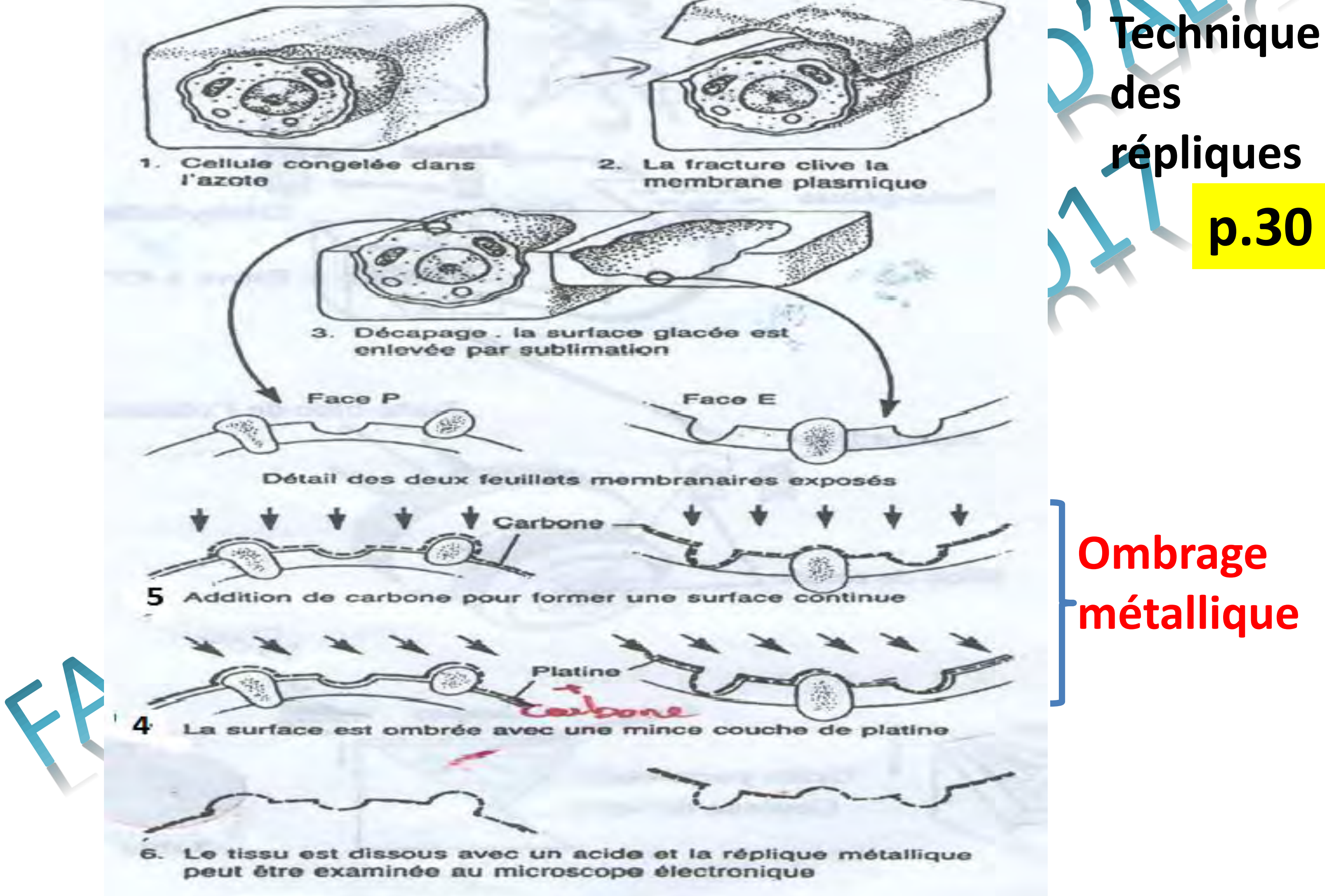
Principe de l'Obtention d'une réplique(moule) de la surface interne



Objectif 3 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique) page 30 fascicule 1



Objectif 3 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique) .

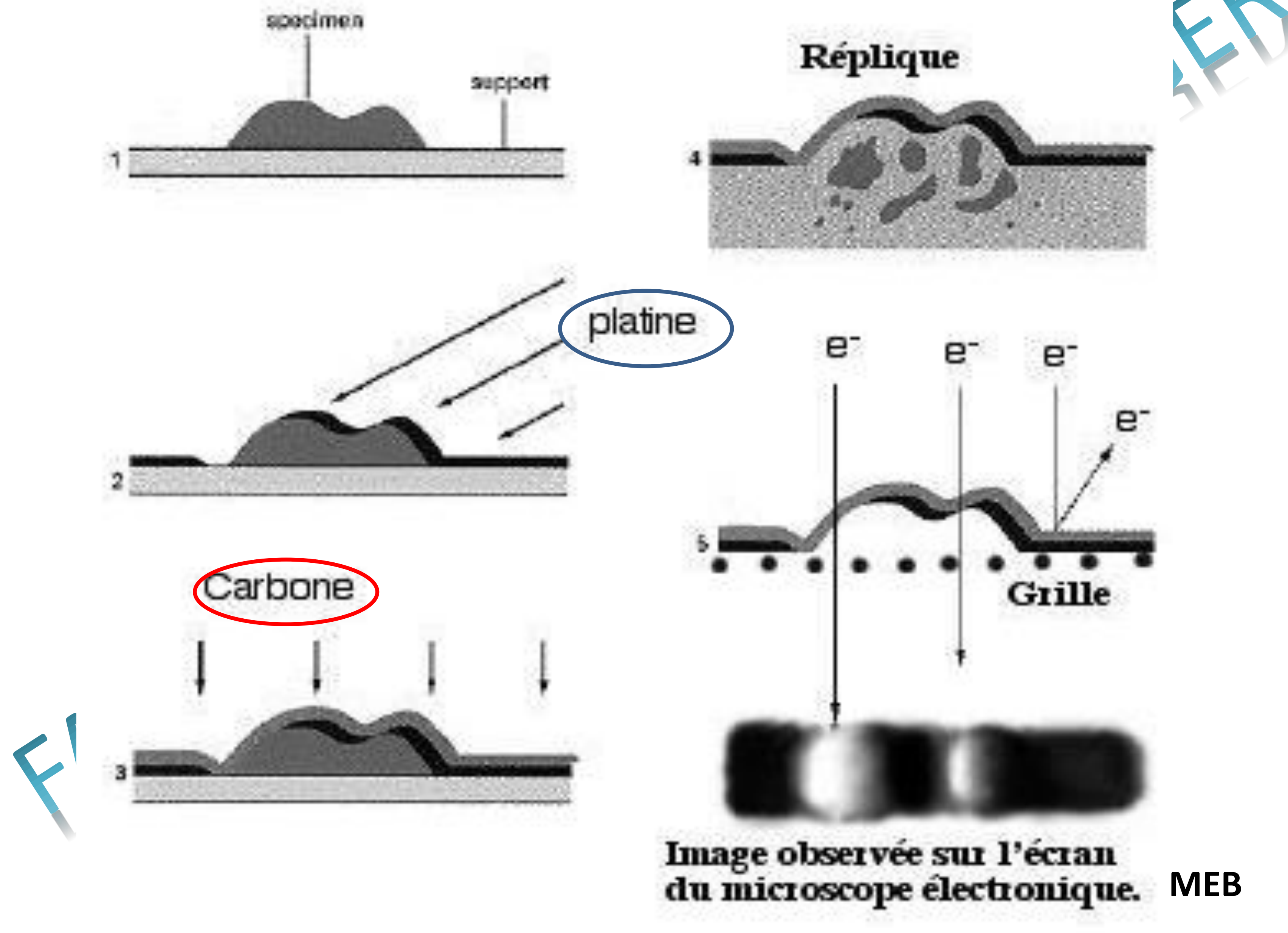


Technique des répliques

p.30

Ombrage métallique

L’ Ombrage métallique



Objectifs spécifiques

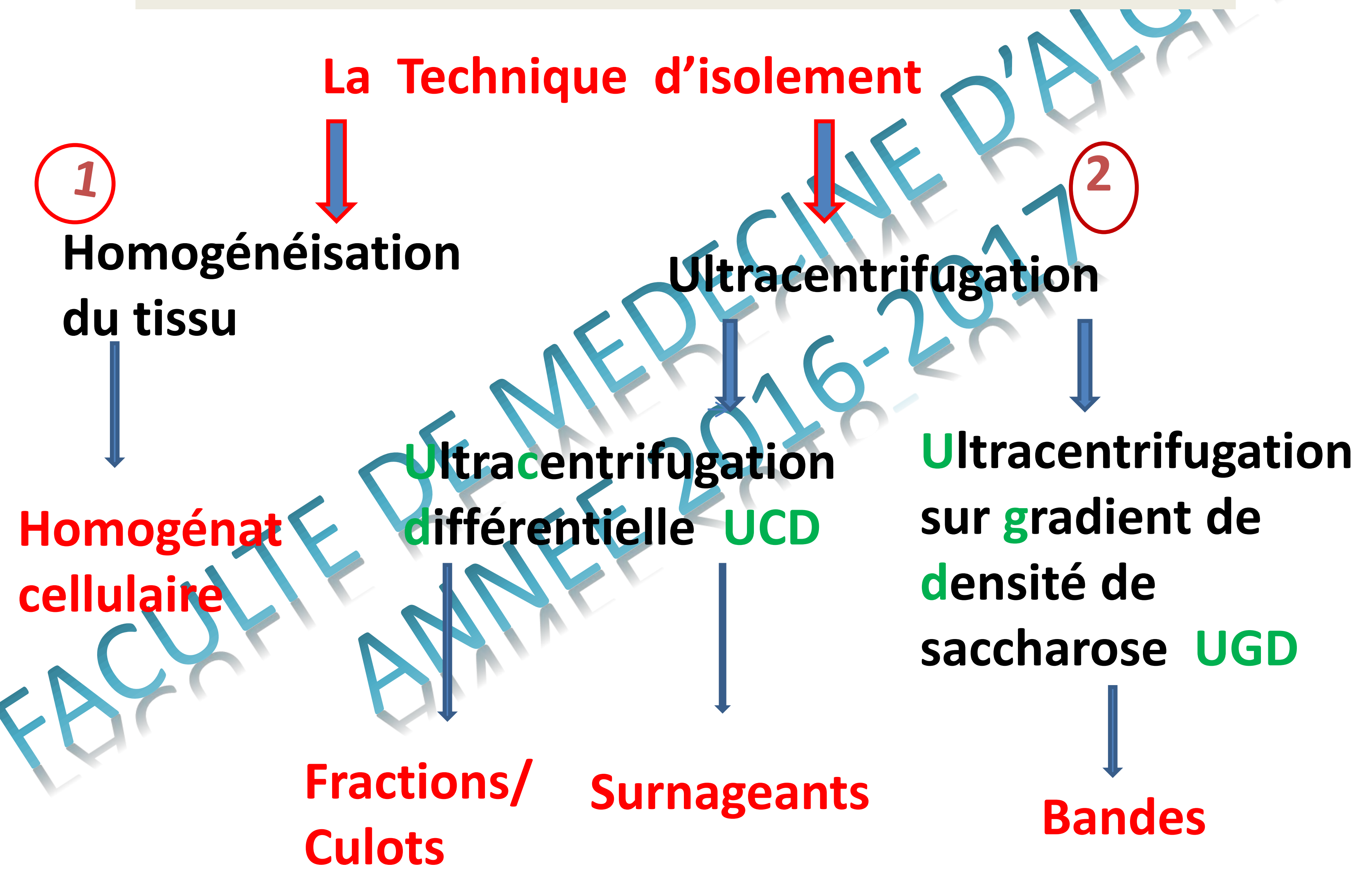
Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

Objectif 2 : Lister les structures obtenues dans chaque culot après application d'une ultra- centrifugation différentielle (UCD).

Objectif 3 :Lister les structures recueillies à partir de chaque culot après application d'une ultra centrifugation sur gradient de densité (UGD).

Objectif 4 :Indiquer les techniques de contraste et d'analyse applicables sur les structures isolées (contraste négatif, chromatographie et électrophorèse).

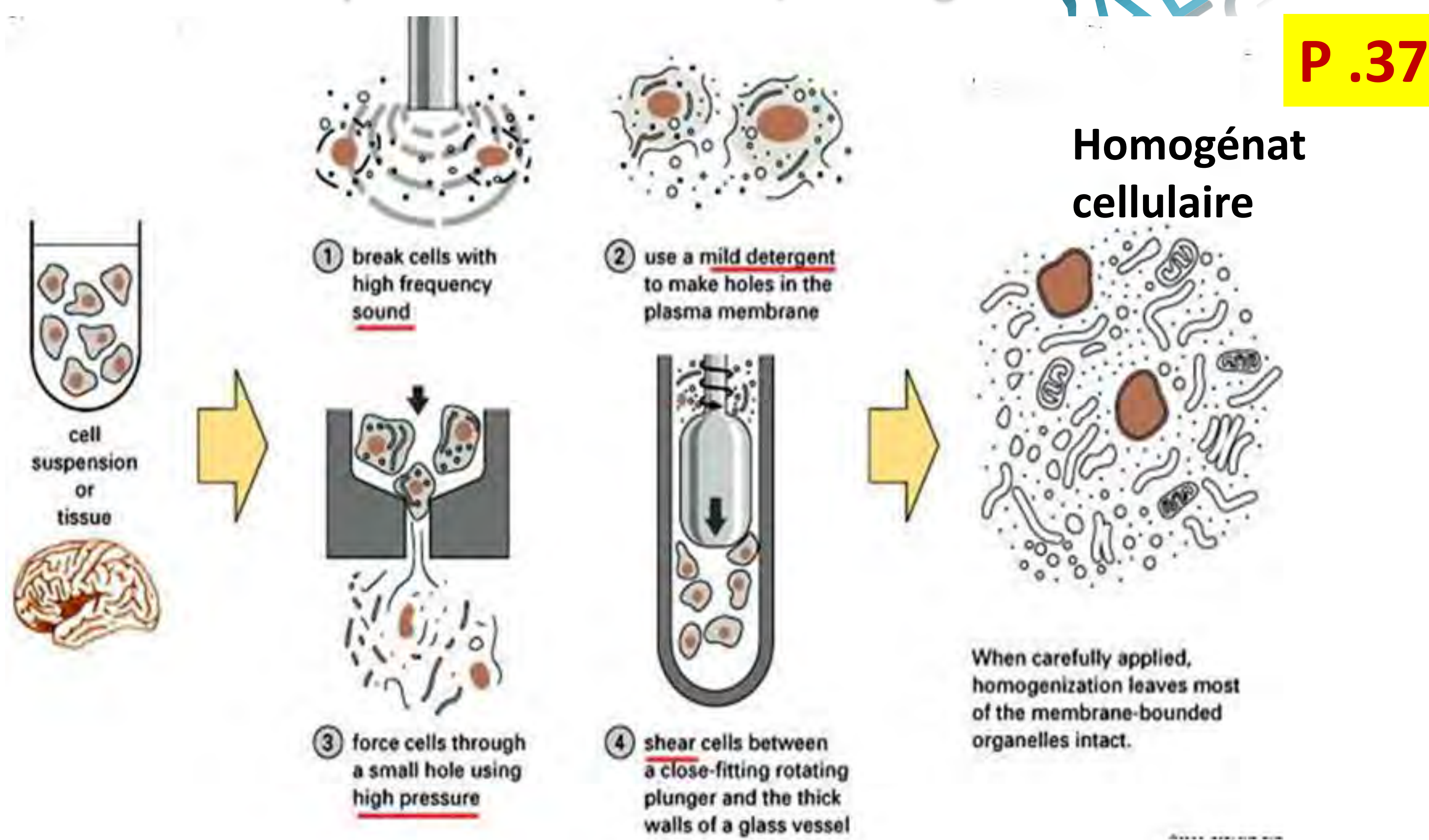
Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).



Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

1 - Principe de fractionnement / homogénéisation

P .37



<u>Objectif 1</u> :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

Les méthodes de fractionnement consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule.

On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intactes, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées microsomes.

<u>Objectif 1</u> :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

2- L'ultracentrifugation différentielle

La centrifugation différentielle est un procédé de séparation des composés de l'homogénat en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge
Pour se faire on centrifuge l'homogénat à différentes vitesses ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot .

- **L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse nommée centrifugeuse**

- **La vitesse de sédimentation est définie par le coefficient de sédimentation en unité Svedberg (S).**

<u>Objectif 1</u> :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

La centrifugeuse et centrifugation

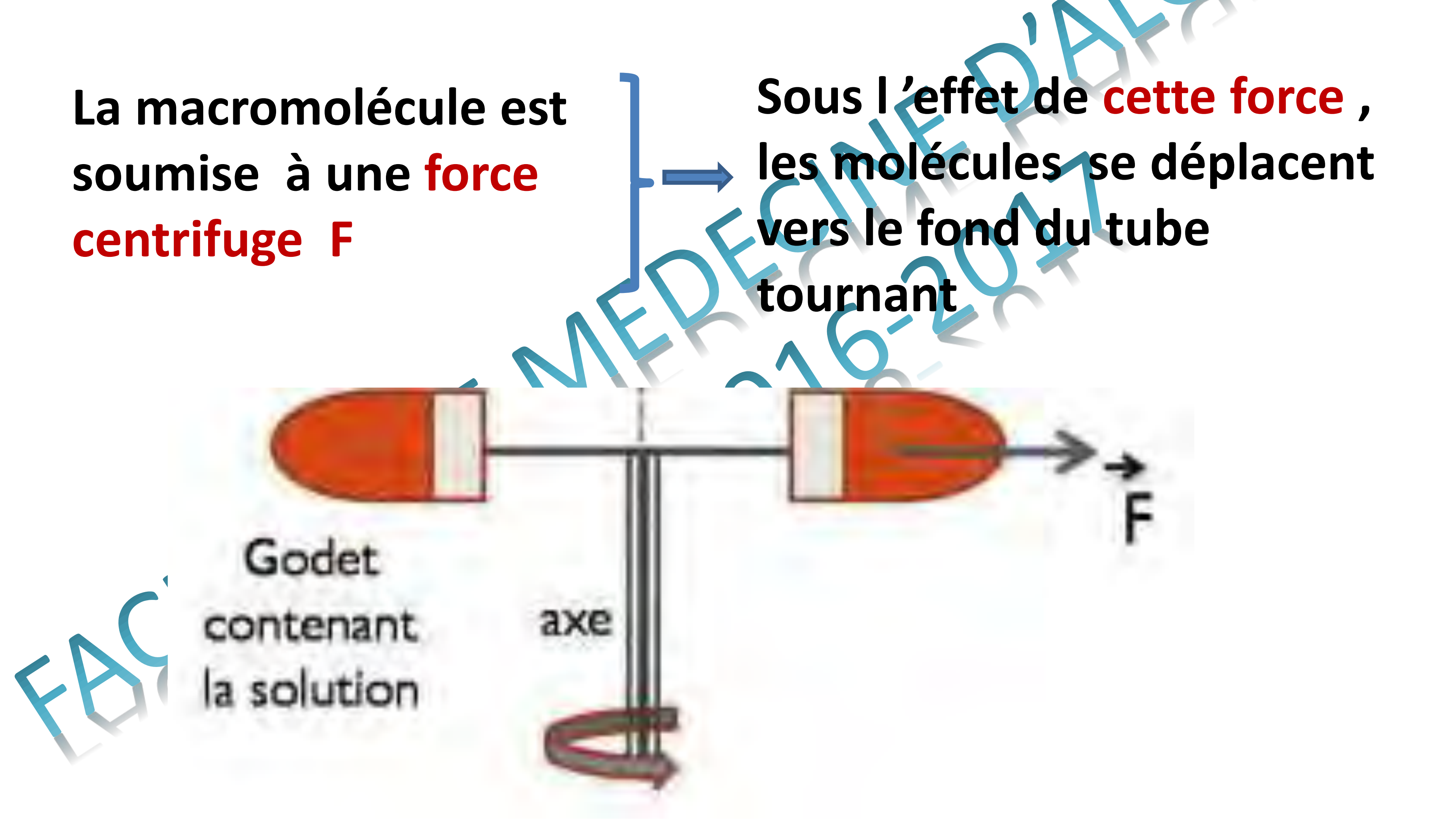
La **centrifugeuse** est constituée d'un **axe** portant un **rotor spécial** . Le rotor porte des **emplacements** qui peuvent recevoir des **tubes** contenants les **préparations biologiques**

).

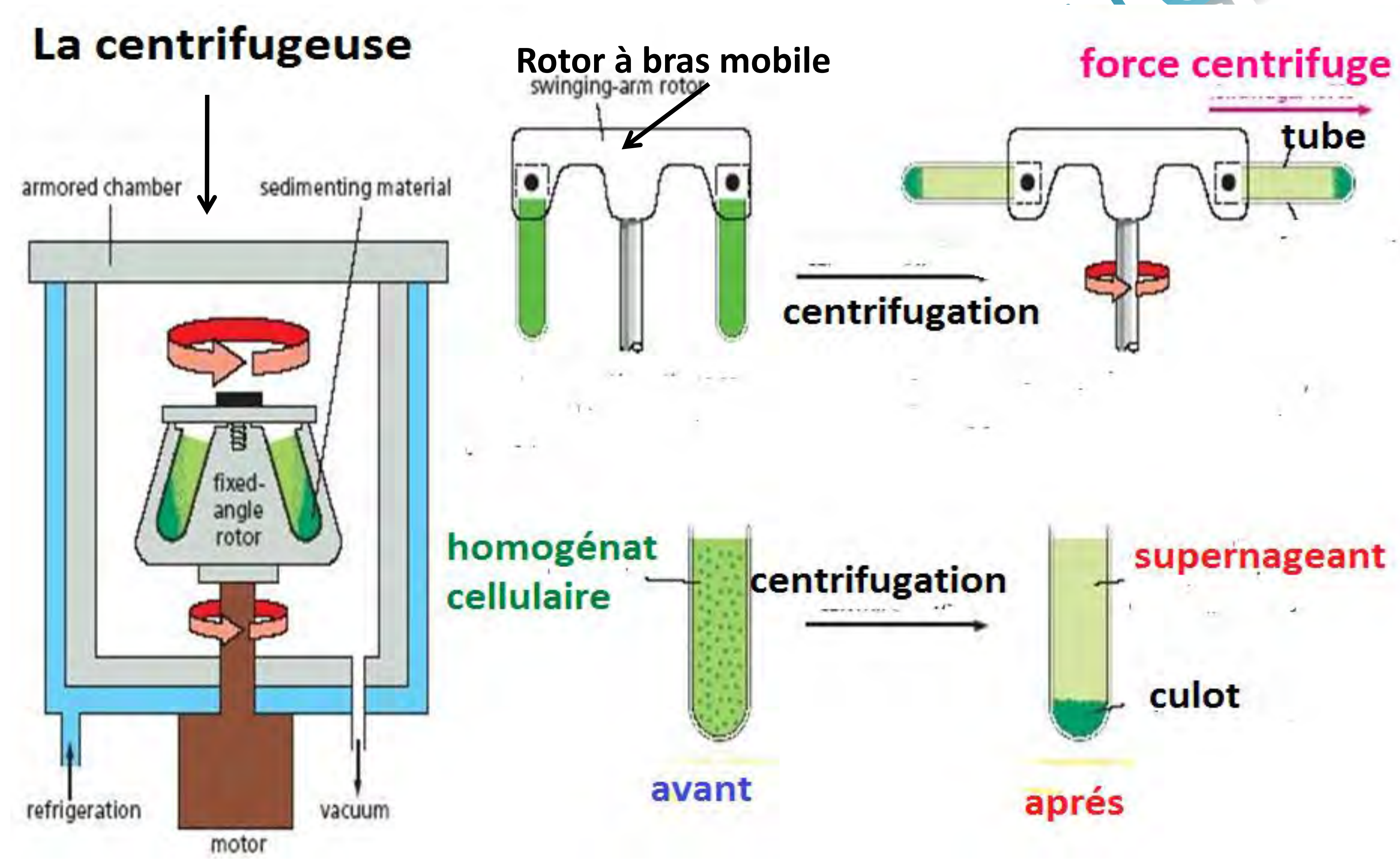


Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD)

La macromolécule est soumise à une force centrifuge F → Sous l'effet de cette force , les molécules se déplacent vers le fond du tube tournant



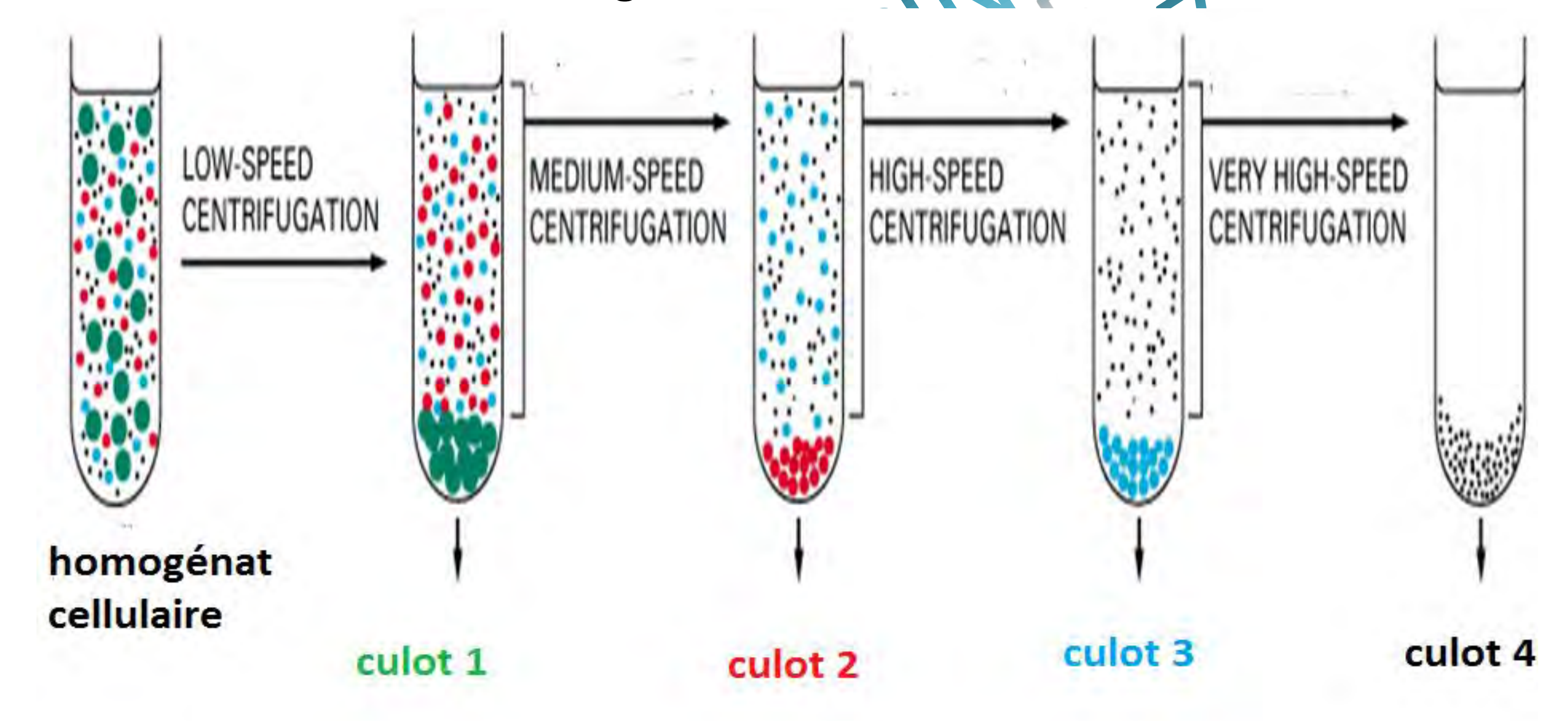
Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD)



Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD)

2 -1 - La centrifugation différentielle

Les constituants de l'homogénat se déposent selon leur densité a des vitesses de centrifugation différentes



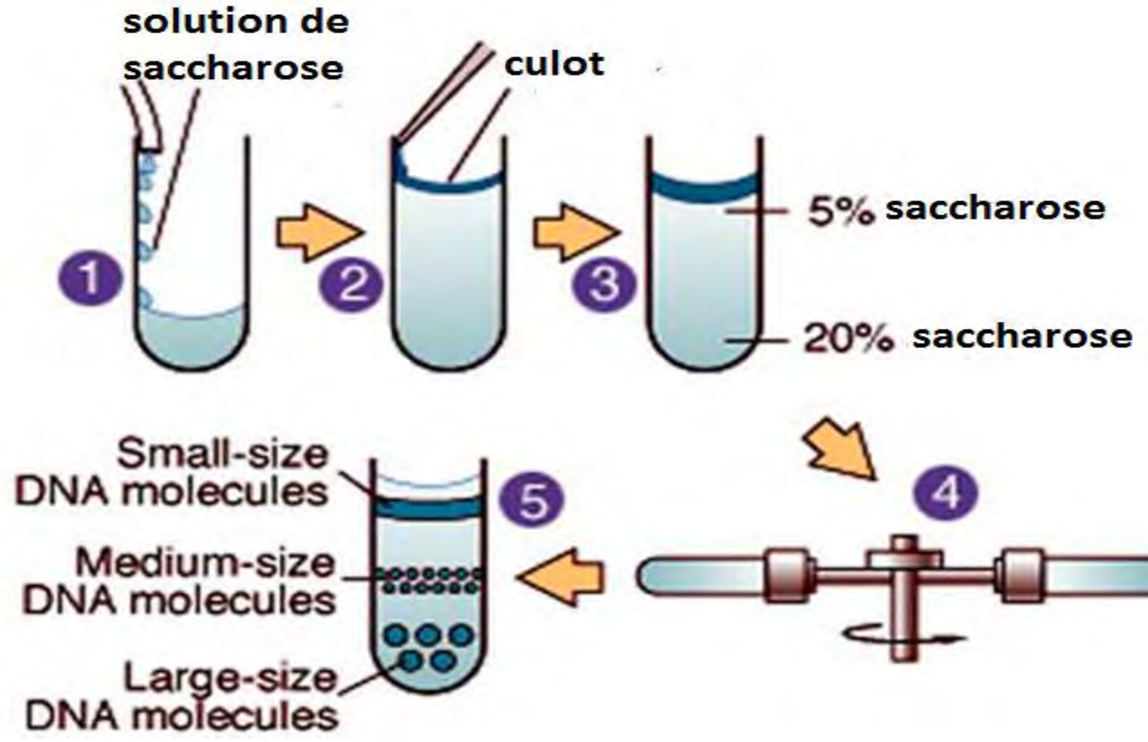
Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD)

2- 2 - La centrifugation sur gradient de densité de saccharose ou UGD

La centrifugation (étape 4) entraine le déplacement des composants du culot (récupéré à l'UCD) à travers le gradient de densité de saccharose et s'arrêtent en une bande à leur densité (étape 5) .

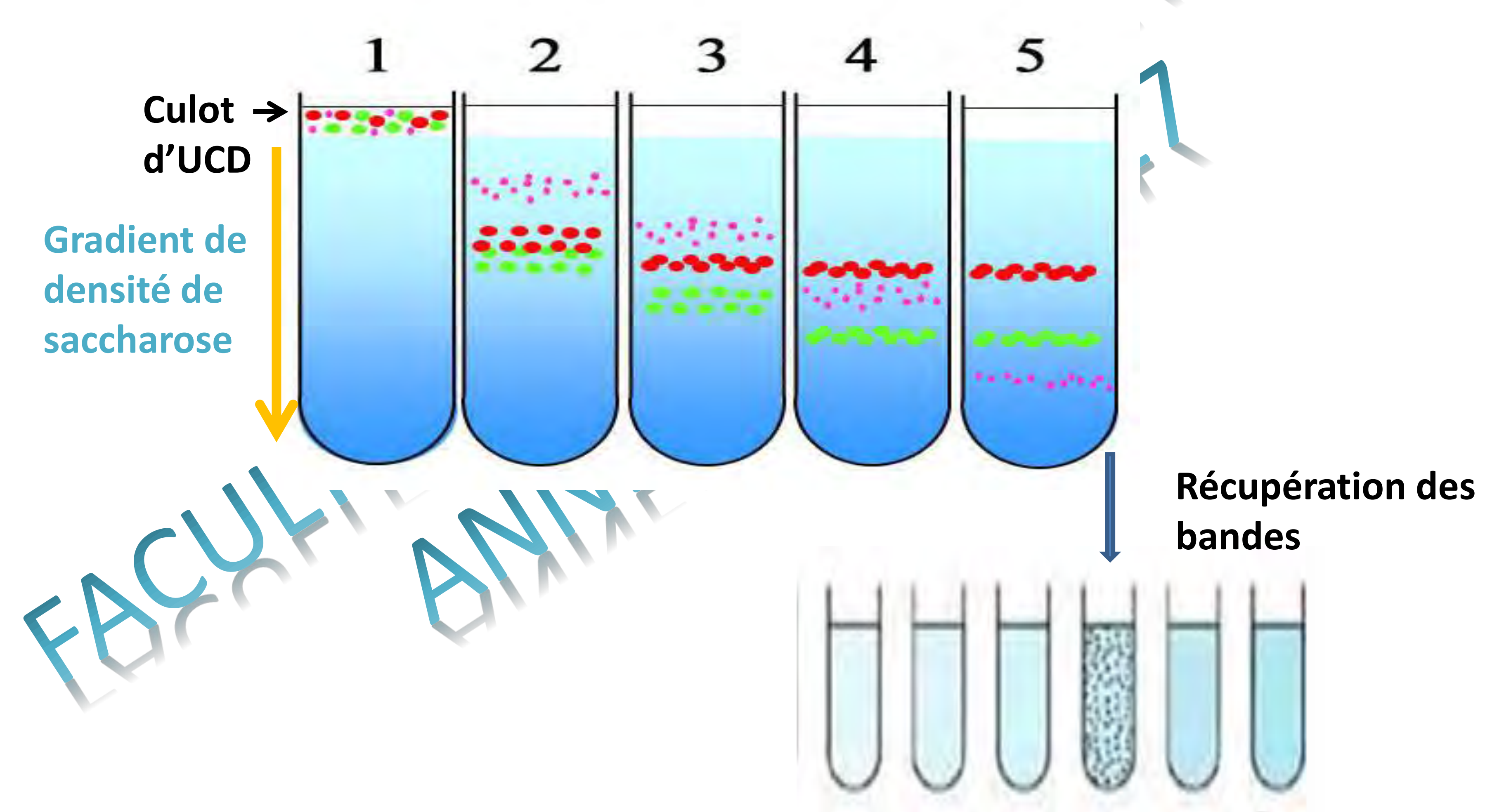
Technique d'UGD

Purification de chaque culot

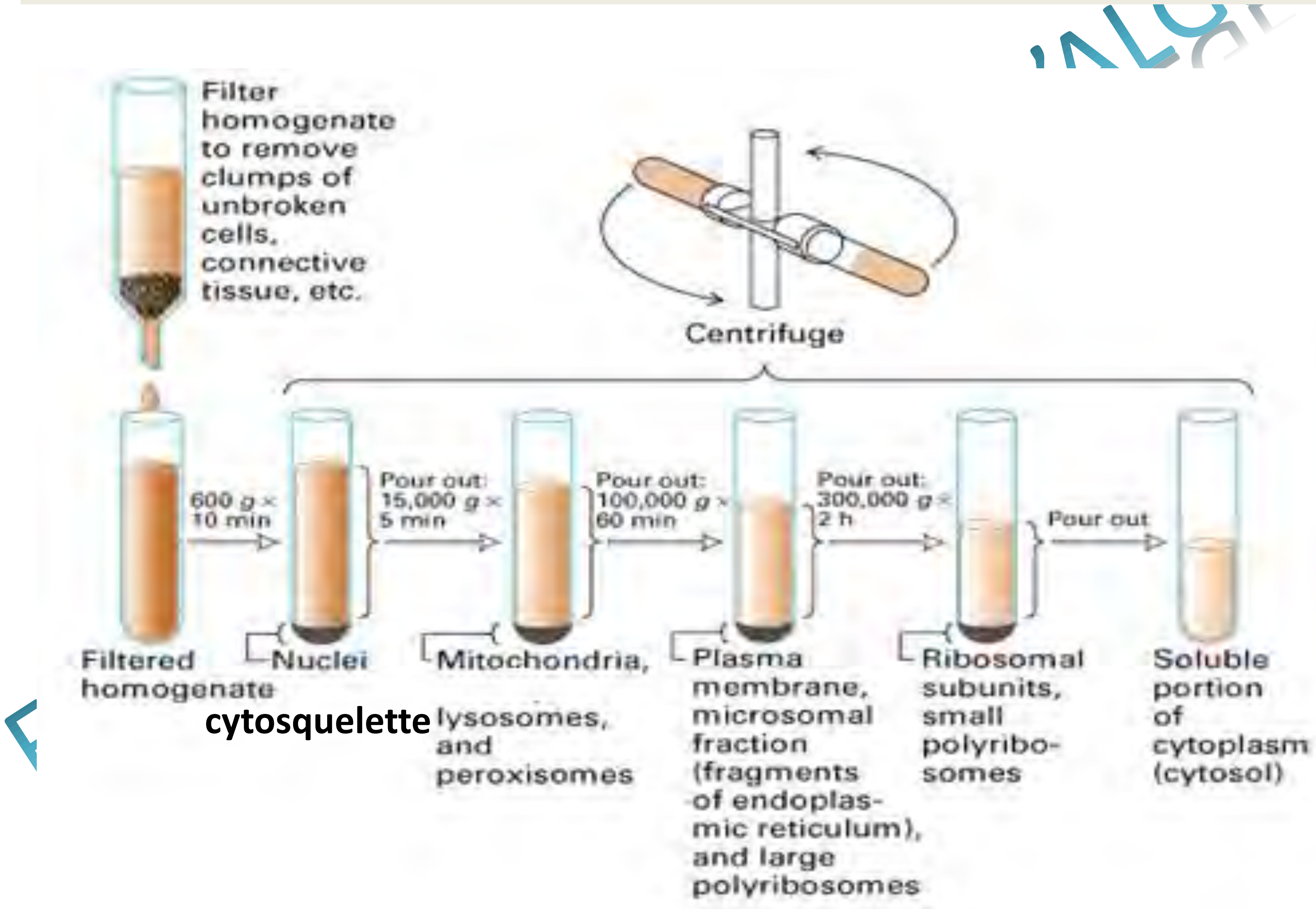


Objectif 1 :Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD)

2- 2 - La centrifugation sur gradient de densité de saccharose ou UGD

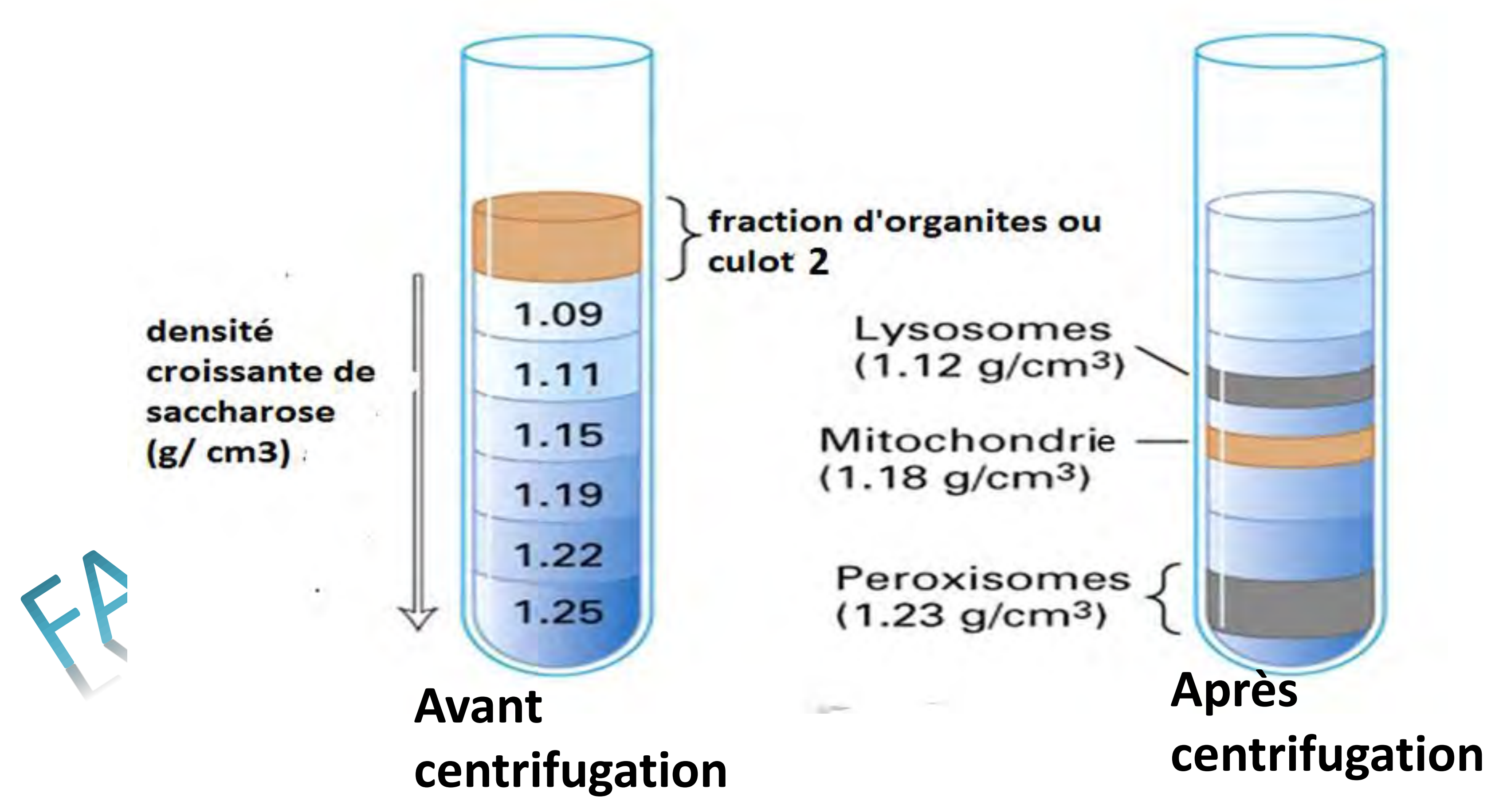


Objectif 2 : **Lister les structures obtenues dans chaque culot après application d'une ultra- centrifugation différentielle (UCD).**



Objectif 3 :Lister les structures recueillies à partir de chaque culot après application d'une ultra centrifugation sur gradient de densité (UGD).

Structures recueillies par UGD du 2 eme culot



Contenu de chaque culot après UGD

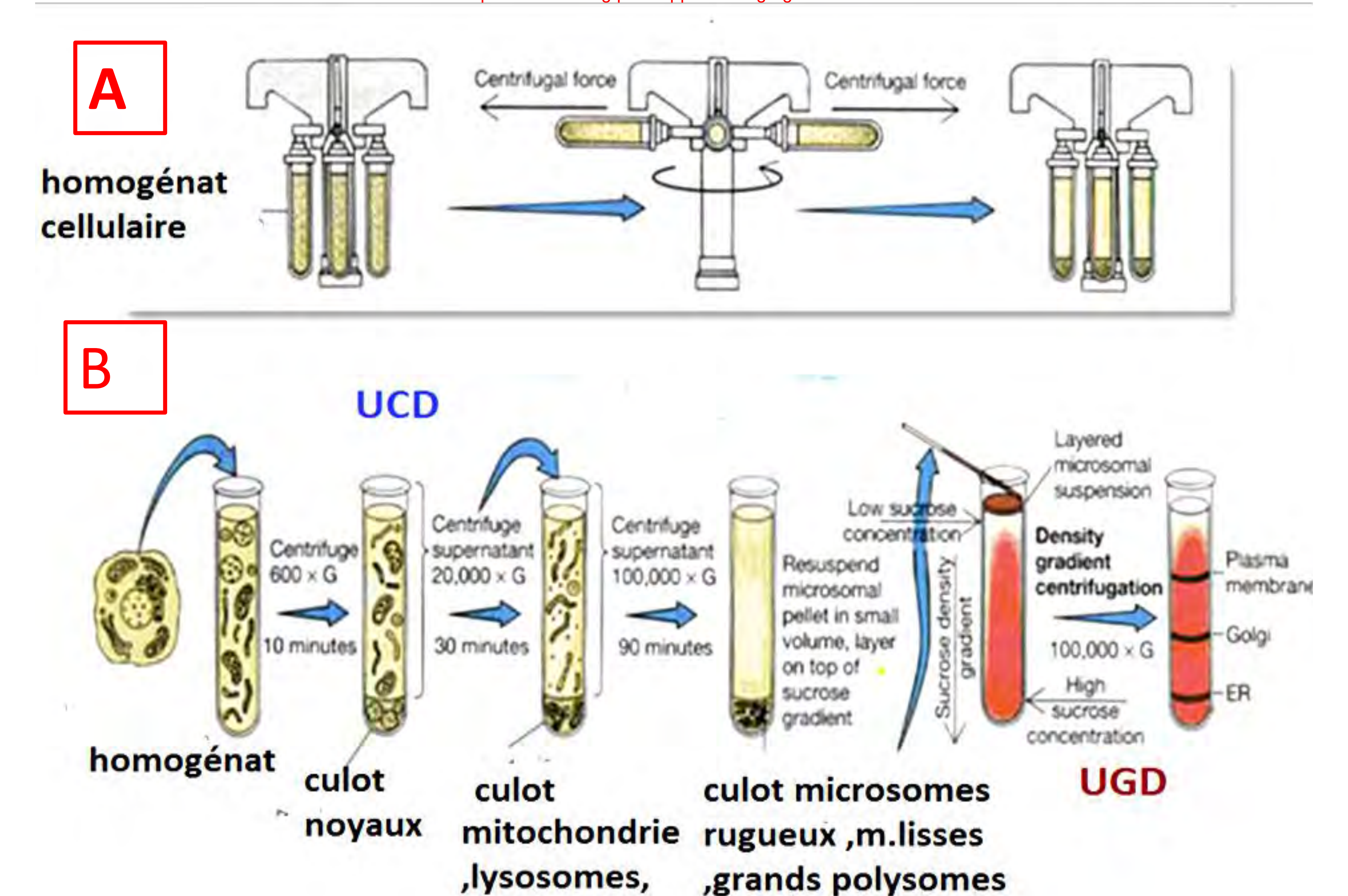
Culot 1 = noyaux + éléments du cytosquelette

Culot 2 = mitochondries + lysosomes + peroxysomes

Culot 3 = grands polysomes +microsomes rugueux (REG) + microsomes lisses (REL , A p .golgi , MP)

Culot 4 = petits polysomes + sous unités ribosomales + macromolécules (glycogène ,triglycéride. .)+ virus (si la cellule fractionné est infectée)

Le surnageant 4 correspond à la solution aqueuse du hyaloplasme


A
homogénat cellulaire
Centrifugal force
Centrifugal force
B
UCD
Centrifuge 600 × G
10 minutes
Centrifuge supernatant 20,000 × G
30 minutes
Centrifuge supernatant 100,000 × G
90 minutes
Resuspend microsomal pellet in small volume, layer on top of sucrose gradient
Low sucrose concentration
Sucrose density gradient
Layered microsomal suspension
Density gradient centrifugation
100,000 × G
High sucrose concentration
Plasma membrane
Golgi
ER
homogénat
culot noyaux
culot mitochondrie ,lysosomes, péroxysomes
culot microsomes rugueux ,m.lisses ,grands polysomes
UGD

Objectif 4 :Indiquer les techniques de contraste et d'analyse applicables sur les structures isolées (contraste négatif, chromatographie et électrophorèse) .

1 - La Technique de coloration négative : diapos 7 -8 -9 pour l'étude morphologique (contraste négatif) des structures isolées (ribosomes ,macromolécules, éléments du cytosquelette, chromatine ,complexe de pores ….)

2 - La chromatographie et l'électrophorèse : pour l'analyse biochimique des structures isolées par centrifugation .